

INDICE

1 INTRODUZIONE	3
1.1 Generalità	3
1.2 Sintesi proteica locale	5
1.3 Effetti di un ambiente arricchito sulla plasticità sinaptica	10
 2 SCOPO DEL LAVORO SPERIMENTALE	 11
2.1 Caratterizzazione del sistema locale di sintesi proteica nelle terminazioni di cervello di ratto.....	11
2.2 Effetto dell'ambiente arricchito sul sistema di sintesi proteica sinaptosomale.....	12
 3 MATERIALI E METODI	 12
3.1 Preparazione dei sinaptosomi dalla corteccia cerebrale	12
3.1.2 Arricchimento sensoriale.....	13
3.1.3 Incorporazione di [³⁵ S]metionina nelle proteine sinaptosomali	14
3.1.4 Analisi elettroforetica delle proteine sinaptosomali neosintetizzate ...	15
3.1.5 Analisi morfologiche	16
3.1.6 Saggio immunoenzimatico (EIA) per la rivelazione del corticosterone nei ratti CA e CI	17

4 RISULTATI	18
4.1 Caratterizzazione del sistema sinaptosomale di sintesi proteica.....	18
4.1.2 Dipendenza della sintesi proteica sulla composizione ionica del mezzo di incubazione	21
4.1.3 Effetto del livello citosolico sulla sintesi proteica sinaptosomale.....	24
4.1.4 Effetto degli inibitori della sintesi proteica sulle curve bifasiche dose / risposta.....	29
4.1.5 Risultati dell'analisi morfologica.....	32
4.2 Risultati arricchimento	33
4.2.1 Analisi biochimiche.....	33
4.2.2 Risultati del test del corticosterone nei ratti CA e CI	33
4.2.3 Confronto del profilo elettroforetico nei ratti CA e CI	34
 5 CONCLUSIONI.....	 35
 6 BIBLIOGRAFIA.....	 39

1. INTRODUZIONE

Il sistema nervoso ha la capacità di acquisire le innumerevoli informazioni provenienti sia dall'ambiente esterno che dall'interno dell'organismo, di selezionarle, confrontarle con dati dell'esperienza precedentemente acquisite ed elaborare una risposta appropriata. Questi processi di elaborazione sono il risultato di un'intera attività bioelettrica e biochimica che esprime una delle caratteristiche peculiari delle cellule nervose: la plasticità. La plasticità è la capacità del sistema nervoso di modificarsi, che avviene durante tutto lo sviluppo dei circuiti neuronali ed è conservata anche nel sistema nervoso dell'adulto al fine di imparare cose nuove, memorizzare nuove informazioni e reagire ad eventuali lesioni. Sebbene i meccanismi responsabili di questi continui cambiamenti non siano del tutto noti, sembra che le risposte plastiche dei circuiti nervosi dell'adulto, siano principalmente da ricondurre a modificazioni finemente regolate dalla forza delle sinapsi già esistenti. I meccanismi molecolari che sono alla base di queste risposte consistono in modificazioni post-traduzionali di proteine già presenti, e nel caso di effetti a lungo termine, in variazioni nel corredo proteico sinaptico e quindi nell'attivazione della sintesi proteica.

Questo argomento ha indirizzato la mia ricerca sulla caratterizzazione e sui meccanismi di regolazioni di un sistema locale di sintesi proteica nelle regioni sinaptiche che rappresentano la sede principale delle variazioni plastiche del sistema nervoso.

1.1 Generalità

Studiare il sistema nervoso e comprenderne le numerose funzioni richiede la conoscenza dei tipi cellulari (neuroni e glia) che lo compongono, le loro reciproche connessioni e il ruolo dei circuiti che essi generano. La struttura di base delle cellule nervose è simile a quella delle altre cellule. Esse possiedono un corpo cellulare che contiene il nucleo, l'apparato del Golgi, il reticolo endoplasmico, i ribosomi, i mitocondri e altri organelli. Il neurone possiede inoltre due tipi di prolungamenti; i dendriti e l'assone che conferiscono al neurone caratteristiche morfologiche del tutto uniche. I dendriti, emergono numerosi dal corpo cellulare, sono deputati alla ricezione dei segnali provenienti dalle altre cellule e sono solitamente provvisti di complesse ramificazioni per cui si parla di arborizzazione dendritica. L'assone è invece un prolungamento unico che può estendersi per poche centinaia di micrometri o per circa un metro e oltre dal corpo cellulare. In particolare le ramificazioni dell'assone si trovano in vicinanza della sua terminazione, consentendogli di prendere

numerosi contatti sinaptici con altri neuroni. Nel sistema nervoso umano sono presenti circa 10^{15} contatti sinaptici, a dimostrazione delle enormi capacità del sistema nervoso di integrare ed elaborare le informazioni. Insieme al corpo cellulare, i dendriti costituiscono la zona ricevente della cellula nervosa. La loro struttura ramificata estende notevolmente la zona di ricezione del neurone. Lungo i dendriti di molte cellule nervose si trovano piccole estroflessioni: le spine dendritiche. Esse sono i punti di contatto sinaptico che ingrandiscono ulteriormente la superficie di ricezione. L'esistenza di un sistema sintetico distinto da quello del corpo cellulare contribuisce alla compartimentalizzazione funzionale nell'ambito dello stesso neurone. Esperimenti recenti hanno evidenziato che il numero delle spine dendritiche diminuisce in seguito a deprivazione sensoriale, mentre la loro morfologia cambia in alcune patologie o dopo sedute di apprendimento. Questi esperimenti suggeriscono un ruolo importante delle spine nella plasticità del sistema nervoso. I segnali ricevuti a livello dei dendriti vengono poi integrati a livello del corpo cellulare nel quale si elabora una opportuna risposta che avrà origine, sotto forma di potenziale d'azione, nel cono d'emergenza, segmento iniziale dell'assone. Il potenziale viaggia senza decremento lungo tutto l'assone fino alla terminazione nervosa dove verrà trasmessa alla cellula successiva. Grazie all'assone, il neurone stabilisce rapporti giunzionali con le altre cellule nervose per la trasmissione delle informazioni elaborate nel corpo cellulare. Il punto di contatto tra due neuroni è definito sinapsi. Essi si distinguono in elettriche e chimiche per la modalità di trasmissione. Nelle prime, lo stimolo viaggia da una cellula nervosa all'altra sotto forma di una corrente elettrica, il cui passaggio è garantito da una continuità intercellulare tra la zona presinaptica che trasmette l'informazione e quella postsinaptica che la riceve. Nelle sinapsi chimiche la trasmissione dello stimolo si realizza invece con il rilascio di un mediatore chimico (neurotrasmettitore) nella regione presinaptica. Il neurotrasmettitore, liberato nella fessura sinaptica, si lega a recettori specifici localizzati sulla membrana postsinaptica. Questo legame induce variazioni di conduttanze ioniche e quindi genesi di un nuovo segnale elettrico.

I neuroni hanno la caratteristica di modificare le proprie connessioni in risposta a stimoli nuovi. Infatti, la modulazione dell'attività elettrica consente di rafforzare determinate connessioni sinaptiche o indebolire ed eliminare quelle silenti. Le modificazioni plastiche del sistema nervoso implicano, quindi, un rimodellamento delle strutture sinaptiche, che richiede attivazione genica e modificazioni del corredo proteico sia presinaptico che postsinaptico (Montarolo et al., 1986; Otani et al., 1989). Ciò giustifica il notevole interesse per l'origine e per le proprietà delle strutture sinaptiche nello studio degli eventi plastici del sistema nervoso.

Il secondo tipo cellulare presente nel sistema nervoso è la glia. Le cellule gliali fungono da elementi di sostegno per i neuroni. Durante lo sviluppo guidano la migrazione dei neuroni e la crescita dei loro assoni, dando forma e struttura al tessuto nervoso. Inoltre, esse garantiscono l'efficienza dei meccanismi di comunicazione dei segnali nervosi mediante la formazione della guaina mielinica che isola gli assoni, e attraverso il controllo dell'ambiente interstiziale delle cellule nervose. Le cellule gliali contribuiscono infatti alla formazione della barriera emato-encefalica che regola gli scambi tra le cellule nervose ed i capillari cerebrali, e possono esercitare una funzione fagocitaria. Inoltre esse sono in grado di liberare fattori di crescita specifici.

1.2 Sintesi proteica locale

La peculiare morfologia del neurone, l'esigenza di un apporto trofico dal corpo cellulare alla periferia neuronale, considerata priva di capacità biosintetica, ha costituito un argomento sufficiente per postulare l'esistenza di un meccanismo specializzato di trasporto detto flusso assoplasmatico (Weiss ed Hiscoe nel 1948). Questo meccanismo affida esclusivamente al soma la sopravvivenza e la funzionalità dei compartimenti periferici. Sarebbe infatti il soma a sintetizzare le proteine necessarie per il mantenimento ed il riarrangiamento sinaptico alla base dei fenomeni plastici. Quest'ultima affermazione ha dato adito a diverse critiche, che hanno suggerito nuove linee di ricerca i cui risultati hanno attribuito alla periferia neuronale un'importanza certamente maggiore. Le principali obiezioni ad un'origine esclusivamente pericariale delle proteine assonali (Alvarez e Torres, 1985) riguardano:

- i) l'incompatibilità tra i tempi di trasporto verso le regioni più distali (Grafstein et al., 1980, Baas, e Brown, 1997) e la vita media delle proteine trasportate (Nixon, 1998);
- ii) la relativa autonomia trofica dell'assone (Bittner, 1991), e la necessità di un meccanismo di segnalazione a due vie tra pericario e terminazioni nervose al fine di garantire l'approvvigionamento di proteine alle sole sinapsi che ne abbiano fatto richiesta;
- iii) l'indipendenza delle dimensioni del corpo cellulare da quelle del compartimento assonale (von Bernhardi e Alvarez, 1989).

Appare quindi difficile sostenere che il flusso assoplasmatico sia l'unico meccanismo responsabile del mantenimento della periferia neuronale. D'altra parte tutte le obiezioni verrebbero facilmente risolte ammettendo l'esistenza di un sistema di sintesi proteica localizzato in periferia in grado di contribuire in maniera rilevante al mantenimento delle regioni più distali del neurone ed alle variazioni plastiche esibite dalle ramificazioni assonali e dalle terminazioni nervose.

Questa visione ha incontrato un generale scetticismo nonostante la convincente evidenza a favore di un sistema di sintesi proteica assonale e presinaptica (Koenig e Giuditta, 1999; Alvarez et al., 2000; Giuditta et al., 2002).

Gran parte di questi dati sono stati ottenuti su sistemi modello, come l'assone di Mauthner del pesce rosso e l'assone gigante del calamaro le cui grandi dimensioni permettono di separare il compartimento assonale da quello gliale e di ottenere un campione di assoplasma praticamente puro. In questi sistemi l'assone è capace di incorporare aminoacidi radioattivi in proteine assoplasmatiche grazie ad un meccanismo sensibile agli inibitori della sintesi proteica ed indipendente dal corpo cellulare (Giuditta et al., 1968; Koenig, 1984; Alvarez et al., 2000 per rassegna). Nell'assone di Mauthner alcune di queste proteine neosintetizzate sono state identificate come proteine del citoscheletro quali neurofilamento leggero e intermedio, α e β -tubuline, e actina (Koenig E., 1991).

Una delle principali ragioni per cui gli assoni erano ritenuti incapaci di sintetizzare proteine era basata sulla presunta mancanza di ribosomi suggerita da osservazioni di microscopia elettronica convenzionale. Prove indirette dell'esistenza di ribosomi nel compartimento assonale sono venute dall'identificazione di rRNA nell'assone di Mauthner (Edstrom et al., 1969; Koenig, 1979) e nell'assone gigante di calamaro (Giuditta et al., 1980). Questi dati sono stati confermati da risultati ottenuti con la tecnica ESI (electron spectroscopic imaging) che rimuove le ambiguità legate alla microscopia elettronica convenzionale, e che ha permesso di rivelare la presenza di ribosomi e polisomi nell'assone gigante del calamaro (Martin et al., 1989; Giuditta et al., 1991). Inoltre, nell'assone gigante del calamaro sono stati messi in evidenza polisomi biologicamente attivi (Giuditta et al., 1991). Risultati simili sono stati ottenuti anche negli assoni di vertebrati (Koenig et al., 2000; Koenig e Martin, 1996) nei quali i ribosomi sono presenti in organelli periferici distribuiti lungo tutto l'assone (placche periassoplasmatiche). Il piccolo spessore di tali organelli e la loro distribuzione intermittente spiegano in parte il perché della loro mancata identificazione con la microscopia elettronica convenzionale.

L'assoplasma dell'assone gigante del calamaro contiene anche tutti i fattori solubili necessari per la sintesi proteica, compresi fattori di trascrizione (Giuditta et al., 1977), tutte le specie di tRNA (Ingolia et al., 1983) ed una popolazione eterogenea di mRNA che codifica per almeno 100-200 proteine (Giuditta et al., 1986; Perrone Capano et al., 1987).

La concentrazione degli mRNA assoplasmatici differisce da quella dei corrispondenti corpi neuronali (Koenig e Giuditta, 1999; Giuditta et al., 2002). In particolare è stato stabilito che essi codificano per molte proteine del citoscheletro come β -actina e β -tubulina (Kaplan et al., 1992), chinesina (Gioio et al., 1994), proteine del neurofilamento (Giuditta et al., 1991), ma anche enzimi

come l'enolasi (Chun et al., 1995), e proteine canale come un peptide con alta omologia per una proteina del reticolo sarcoplasmatico (Chun et al., 1997). Queste ultime osservazioni hanno permesso di stabilire in maniera inequivocabile la presenza di un sistema di sintesi proteica locale nell'assone gigante del calamaro. Dati analoghi hanno successivamente riguardato la presenza di mRNA che codificano per diversi tipi di proteine negli assoni di altri modelli animali. Negli assoni dei molluschi *Aplysia californica* e *Lymnea stagnalis* sono presenti mRNA che codificano per neuropeptidi (van Minnen J., 1994, Landry et al., 1991). Inoltre nell'assoplasma dell'assone di Mauthner è stato evidenziato l'mRNA per il neurofilamento intermedio (Weiner et al., 1996). In assoni localizzati nel tratto posteriore della neuroipofisi del ratto sono stati trovati mRNA che codificano per ossitocina (Jirikowsky et al., 1990), neuropeptidi e NF-L (Mohr e Richter, 1992), vasopressina (Trembleau et al., 1996). La presenza di questi messaggeri lascia supporre un loro coinvolgimento in processi locali di traduzione, come è stato effettivamente dimostrato in neuroni di *Lymnea stagnalis* in coltura (van Minnen et al., 1997). Questi dati hanno suggerito la possibilità dell'esistenza di un sistema di sintesi locale anche nelle terminazioni nervose.

Un modello ideale per lo studio delle funzioni sinaptiche in vitro sono i sinaptosomi che mantengono la morfologia e la composizione chimica presente nelle terminazioni nervose in vivo, costituendo un preparato utile per esaminare l'eventuale presenza di un attivo sistema di sintesi proteica nelle terminazioni nervose. I sinaptosomi sono organelli vescicolari che si formano per fusione delle membrane plasmatiche delle terminazioni nervose, delle cellule gliali e dei sottili prolungamenti dendritici durante l'omogenizzazione del cervello (Whittaker, 1993). Con una successiva purificazione, attraverso un gradiente discontinuo di Ficoll, si giunge alla separazione di tre frazioni principali. La frazione mitocondriale al fondo del gradiente, la frazione sinaptosomale nella parte intermedia e la frazione mielinica nella parte meno densa. Al microscopio elettronico la frazione sinaptosomale si presenta costituita quasi esclusivamente da strutture rotondeggianti limitate da membrana, del diametro di 0,2-0,8 µm. Le terminazioni nervose, identificabili grazie alla presenza di vescicole sinaptiche ed uno o più mitocondri intraterminali, rappresentano la componente maggiore della preparazione, che contiene anche mitocondri liberi, frammenti dendritici, e processi gliali (Autilio et al., 1968).

Una moltitudine di dati della letteratura (per rassegna Whittaker, 1993 e Alvarez et al., 2000) hanno evidenziato che un sistema di sintesi proteica è presente nei sinaptosomi, e che tale sistema è così caratterizzato:

- include l'attività di almeno due sistemi di sintesi proteica: uno mitocondriale sensibile al cloramfenicolo ed uno citoplasmatico sensibile alla cicloesimide;

- è circondato da membrana in quanto insensibile all'azione dell'RNAsi (Morgan e Austin, 1968);
- è circondato da membrana in quanto insensibile all'azione dell'RNAsi (Morgan e Austin, 1968);
- è fortemente influenzato dalla composizione ionica del mezzo ed è indipendente da fonti di energia esogene (Autilio et al., 1968).

La localizzazione di questo sistema è molto controversa. Nei primi studi sulla sintesi proteica di cervello di ratto si riteneva che tale attività di sintesi si dovesse attribuire esclusivamente alla terminazione nervosa (per rassegna Whittaker, 1993). Molti studi appoggiano questa visione (Koenig e Giuditta, 1999; Alvarez et al., 2000; Giuditta et al., 2002). Difatti, le prime ricerche, condotte con metodi autoradiografici, mostravano la prevalente localizzazione delle proteine neosintetizzate in strutture presinaptiche (Cotman e Taylor, 1972; Gambetti et al., 1972). Successivamente, la dimostrazione di polisomi biologicamente attivi nelle spine dendritiche e nelle regioni sub-sinaptiche (Steward e Shuman, 2003) ha fatto protendere per una localizzazione del sistema di sintesi proteica sinaptosomale nel compartimento dendritico (Rao e Steward, 1991) e in minor misura gliale (Henn et al., 1976; Sieghart e Singer, 1979).

Tuttavia diverse linee di ricerca hanno continuato a sostenere l'ipotesi di una sintesi proteica presinaptica (Koenig e Giuditta, 1999; Alvarez et al., 2000; Giuditta et al., 2002). In particolare numerosi dati sono stati collezionati sui sinaptosomi del calamaro, che hanno dimostrato inequivocabilmente la localizzazione presinaptica di un sistema di sintesi proteica. La preparazione di sinaptosomi di calamaro offre i seguenti vantaggi rispetto a quelli di mammifero:

- assoni privi di guaina mielinica, il che riduce l'eterogeneità delle particelle presenti nell'omogenato;
- minor numero di cellule gliali, il che riduce notevolmente il grado di contaminazione da parte di queste strutture;
- sinapsi di tipo asso-assonico, il che esclude la contaminazione da parte dei frammenti dendritici;
- isolamento della frazione sinaptosomale come pellicola galleggiante, il che protegge la struttura dei sinaptosomi.

In particolare, il sistema modello del calamaro è particolarmente vantaggioso sia per i motivi sopraesposti, sia per la particolare struttura dei lobi ottici che costituiscono la parte prevalente del cervello. Infatti, le grandi terminazioni nervose dei fotorecettori retinici terminano appunto nei lobi ottici dove, in seguito all'omogenizzazione del tessuto, danno origine a sinaptosomi altrettanto grandi (Crispino et al., 1993a). Una prima indicazione della presenza di un sistema di traduzione

nelle grandi terminazioni nervose del lobo ottico si è ottenuta da alcune analisi immunochimiche che hanno dimostrato la loro capacità di sintetizzare proteine del neurofilamento diverse da quelle sintetizzate nei corpi cellulari (Crispino et al., 1993b). Tuttavia, come per l'assone gigante del calamaro, l'evidenza più convincente è stata di tipo morfologico. Si è infatti dimostrato che questi grandi terminazioni nervose sono le uniche strutture sinaptosomali che mostrano un'attività di sintesi proteica e sono anche le uniche strutture contenenti polisomi attivi (Crispino et al., 1997).

Questi ultimi dati sono stati successivamente confermati con altri esperimenti (Martin et al., 1998) e sono la prova inequivocabile dell'esistenza di un sistema di sintesi proteica nelle terminazioni nervose. Infatti, nei grandi sinaptosomi del lobo ottico è stata identificata una famiglia eterogenea di mRNA (Gioio et al., 2004), in grado di codificare per almeno 80 specie proteiche, come emerso in un recente studio con metodi di spettrometria di massa, tra cui proteine mitocondriali codificate dal nucleo, proteine del citoscheletro, enzimi e la proteina hsp70 (Jimenez et al., 2002). È opportuno sottolineare che gli mRNA presinaptici del calamaro codificano per proteine mitocondriali codificate dal DNA nucleare. Questi ultimi dati puntualizzano infatti l'importanza della sintesi proteica locale nel processo di mantenimento dei mitocondri presinaptici e giustificano la stretta vicinanza di aggregati di ribosomi ai mitocondri presinaptici ed assionali (Bleher et al 2001).

Molti dati sono stati collezionati sul coinvolgimento dei sistemi di sintesi proteica locale nell'apprendimento negli invertebrati che hanno aperto una nuova prospettiva nello studio dei fenomeni plastici del sistema nervoso. La plasticità neuronale è la capacità di riorganizzare dei circuiti nervosi sia durante lo sviluppo e l'invecchiamento, sia nell'adulto in risposta a stimoli provenienti dall'ambiente esterno (nuova esperienza). La riorganizzazione dei circuiti nervosi presuppone una variazione dell'efficacia sinaptica che si realizza mediante un riarrangiamento non solo morfologico ma anche biochimico delle sinapsi coinvolte. In particolare le funzioni cognitive sono basate, in gran parte, su variazioni plastiche a lungo termine delle regioni sinaptiche che richiedono attivazione genica e sintesi di nuove proteine sia presinaptiche che postsinaptiche (Montarolo et al., 1986; Otani et al., 1989). Nel contesto presinaptico si inseriscono i numerosi studi effettuati sul gasteropode marino *Aplysia* (per rassegna vedi Kandel 2001) che offre il vantaggio di possedere un numero limitato di neuroni facilmente identificabili, e si presta bene all'analisi di forme semplici di apprendimento. Infatti, nei neuroni di *Aplysia* in coltura si è dimostrata l'esistenza di un sistema di sintesi locale presinaptico che svolge un ruolo cruciale nella sensibilizzazione a lungo termine (Martin et al., 1997 e 2000; Kang e Shuman, 1996; Casadio et al., 1999). Una simile dipendenza è stata riportata anche per la facilitazione a lungo termine nel gambero (Beaumont et al., 2001).

Sebbene questi dati riguardano esclusivamente gli invertebrati, sarebbe interessante ipotizzare l'esistenza di un sistema di sintesi proteica locale nel mammifero e studiare l'eventuale coinvolgimento di tale sistema nei fenomeni plastici. Infatti, nel mio gruppo di ricerca è stato dimostrato che un apprendimento associativo di tipo complesso, come l'evitamento attivo a due vie (shuttle box), induce l'aumentata sintesi di ben due proteine sinaptosomali (Eyman et al. 2006). Tale aumento è specifico e non riproducibile in un apprendimento più semplice, come ad esempio l'abitudine spaziale. Quindi ancora una volta si è dimostrato come i fenomeni plastici modulano selettivamente l'attività di sintesi proteica sinaptica.

In accordo con queste linee di ricerca sono anche i dati relativi alla presenza di diversi mRNA nelle regioni presinaptiche (Alvarez et al., 2000), come ad esempio l'mRNA per (olfactory marker protein) (OMP) presente nelle terminazioni nervose dei neuroni olfattivi del ratto (Wensley et al., 1995). Inoltre, risultati ottenuti con tecniche RT-PCR semiquantitative hanno dimostrato il selettivo arricchimento di mRNA per GAT-1 e GFAP, rispettivamente una proteina presinaptica e una gliale, nella frazione sinaptosomale di cervello di ratto (Crispino et al., 2001). Questi risultati hanno ragionevolmente incoraggiato l'ipotesi dell'esistenza di un sistema locale di sintesi proteica nelle regioni persinaptiche del cervello di ratto.

1.3 Effetti di un ambiente arricchito sulla plasticità sinaptica

La plasticità neuronale è la capacità di riorganizzare i circuiti nervosi sia durante lo sviluppo e l'invecchiamento, sia nell'adulto in risposta a stimoli provenienti dall'ambiente esterno (nuova esperienza). Un esempio di plasticità è l'arricchimento sensoriale. I primi esperimenti di questo tipo svolti, negli anni 60', da Rosenzweig (Rosenzweig et al 1962, Rosenzweig et al 1969), hanno mostrato che l'esposizione di ratti ad ambienti di diversa complessità produce modifiche sia morfologiche che biochimiche del sistema nervoso. Infatti in questi lavori si è dimostrato come l'esposizione di ratti in ambienti di diversa complessità può indurre cambiamenti comportamentali come conseguenza di modificazioni cerebrali.

Il gruppo di Rosenzweig partiva dall'assegnazione di figliate di ratti dello stesso sesso a diversi ambienti. Infatti, ratti dello stesso sesso e della stessa nidiata vennero posti in due ambienti differenti: una condizione arricchita (CA) costituita da una grande gabbia che conteneva oggetti di diversa forma, superficie ed colore. Un ambiente "impoverito", in cui i ratti venivano posti separatamente in singole gabbie solo con acqua e cibo.

Al termine dell'esposizione a tali ambienti è stato notato che i ratti della CA mostravano cambiamenti sia neurochimici che anatomici quali: 1) livelli di acetilcolina-esterasi maggiori; 2) maggiore spessore della corteccia cerebrale occipitale; 3) maggiore dimensione di nuclei e di corpi cellulari neuronali; 4) maggior numero di spine dendritiche; 5) maggior numero di sinapsi per neurone. Inoltre misure del rapporto RNA/DNA corticali hanno dimostrato che, dopo un'esposizione di 30 giorni, i valori di tale rapporto sono più grandi nei CA, sia per il valore più basso del rapporto DNA/peso corteccia che per il valore più alto del rapporto RNA/peso corteccia. Questo significa che a parità di quantità di DNA aumenta invece la quantità di RNA e ciò si riflette in un aumento dell'attività di sintesi proteica. Questi lavori hanno dimostrato che l'esposizione di ratti in ambienti di diversa complessità produce dei cambiamenti comportamentali e di conseguenza cerebrali e hanno suggerito l'analisi dell'eventuale coinvolgimento (modulazione) dell'attività di sintesi proteica sinaptosomale nell'acquisizione di particolari esperienze sensoriali (arricchimento sensoriale). Queste variazioni potrebbero essere realizzate grazie al sistema di sintesi proteica localizzato nelle terminazioni nervose di cui abbiamo precedentemente parlato che assumerebbe, quindi, grande importanza nell'ambito della plasticità del sistema nervoso. Pertanto utilizzando come modello sperimentale i sinaptosomi di cervello di ratto, siamo andati a studiare l'eventuale modulazione della sintesi proteica sinaptosomale a seguito di un arricchimento sensoriale.

2. SCOPO DEL LAVORO SPERIMENTALE

2.1 Caratterizzazione del sistema locale di sintesi proteica nelle terminazioni di cervello di ratto

La dimostrazione della presenza di un sistema di sintesi proteica assonale e presinaptico nel calamaro ci ha indotto a verificare l'esistenza di un analogo sistema nelle terminazioni nervose di cervello di ratto. Gli esperimenti sono indirizzati alla valutazione della dipendenza della sintesi proteica sinaptosomale dalla composizione ionica del mezzo di incubazione e della concentrazione del calcio citosolico, atti a dimostrare che la sintesi proteica riflette l'attività di più di un sistema citoplasmatico. Inoltre, poiché i sinaptosomi del cervello di ratto, non derivano esclusivamente dalle terminazioni nervose, lo scopo di questo lavoro sarà anche quello di localizzare un sistema citoplasmatico di sintesi proteica nei sinaptosomi presinaptici.

2.2 Effetto dell'ambiente arricchito sul sistema di sintesi proteica sinaptosomale

Abbiamo studiato l'eventuale modulazione della sintesi proteica sinaptosomale ponendo gli animali in un ambiente arricchito. A tale scopo sono state utilizzate frazioni sinaptosomali ottenute da specifiche regioni cerebrali; (corteccia e ippocampo), funzionalmente associate alle attività cognitive ed all'elaborazione delle informazioni. Per questo lavoro è stata valutata l'attività specifica della frazione sinaptosomale e il profilo elettroforetico delle proteine neosintetizzate dei ratti esposti sia ad una condizione arricchita che impoverita. Inoltre, per escludere che un eventuale variazione biochimica non sia dovuta allo stato di stress indotto nei ratti dal protocollo di arricchimento ma che sia esclusiva della condizione arricchita, è stata effettuata una misura del livello serico di un ormone glucocorticoide, il corticosterone come indice dello stress subito dall'animale.

Lo stress è un'intensa reazione emotiva a stimoli esterni ed interni, che produce risposte adattative. Esso è un processo psicobiologico, con componenti e conseguenze fisiologiche e psicologiche. Diversi esperimenti hanno dimostrato che il corpo reagisce a condizioni stressanti con una sindrome di adattamento generale che comprende tre stadi: l'allarme, la resistenza e l'esaurimento. Nei ratti, in condizioni di stress, si ha un aumento di corticosterone che viene prodotto dalla corticale delle ghiandole surrenali ed è sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (letteratura).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Preparazione dei sinaptosomi dalla corteccia cerebrale

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Wistar maschi di circa 2 mesi (ratti adulti). Per gli esperimenti di apprendimento sensoriale sono stati utilizzati ratti dello stesso peso e nidiata di circa 20gg di età, appaiati per omologia di peso corporeo (100-120grammi). Tutti gli animali sono stati acquistati dalla ditta Charles River. Gli animali, anestetizzati con CO₂, sono stati decapitati e dal cervello sono state rapidamente prelevate la corteccia e l'ippocampo. Dagli animali CA e CI, dopo il sacrificio, (per il test del corticosterone), sono state raccolte in tubi eparinizzati frazioni di sangue(vedi oltre).

La preparazione di sinaptosomi è stata effettuata secondo una modificazione del metodo pubblicato da Rao e Steward 1991 e Crispino et al 2001. Il tessuto (1gr circa) è stato omogenato con un omogenizzatore Dounce in 9 volumi di una soluzione contenente saccarosio 0.32 M, Tris-Cl 10 mM (pH 7.4) (tampone A). L'omogenato è stato centrifugato nel rotore JA-17 di una centrifuga Beckman JA-21 (4200 rpm per 1'; 4°C) ottenendo un sedimento costituito prevalentemente da nuclei (P1) e un sopranatante (S1). La frazione P1 è stata risospesa in 9 volumi di tampone A e

centrifugato come sopra. I due sopranatanti, dopo essere stati mescolati, sono stati centrifugati nello stesso rotore ad alta velocità (13200 rpm per 4'; 4°C) per ottenere un sedimento costituito da mitocondri, sinaptosomi e mielina (P2) e un secondo sopranatante costituito dai microsomi(S2). La frazione P2 è stata risospesa in 9 ml di tampone A e centrifugata nelle stesse condizioni. Il sedimento così ottenuto è stato diluito con il tampone A fino alla concentrazione proteica di 4mg/ml e statificato su un gradiente discontinuo di Ficoll in tampone A (1 ml di sospensione, 2ml di 5% Ficoll, 2ml di 13% Ficoll). Il gradiente è stato quindi centrifugato nel rotore SW-55 di una ultracentrifuga Beckman (24400 rpm per 45'; 4°C). La frazione sinaptosomale, prelevata dall'interfaccia tra Ficoll 5% e 13%, è stata diluita 10 volte con tampone A e centrifugata nel rotore JA-17 di una centrifuga Beckman JA-21 (13200 rpm per 20'; 4°C). Il pellet, così ottenuto è stato risospeso in un piccolo volume di tampone A. Il contenuto proteico di tale sospensione è stato valutato con il metodo BIO-RAD usando come proteina di riferimento l'albumina di siero bovino(BSA).

3.1.2 Arricchimento sensoriale

Gli esperimenti sono stati condotti su ratti Wistar maschi della stessa nidiata di circa 20 giorni di età e di 80-100 grammi di peso. Dieci ratti sono stati posti nella condizione di ambiente arricchito (CA) e sei in quella di ambiente impoverito (CI). In CA i tre ratti erano tenuti insieme in una gabbia grande contenente diversi oggetti di varia natura, forma e colore ed in compagnia di altri ratti. In CI ciascun ratto è stato posto in una gabbia singola più piccola, priva di oggetti e senza alcun contatto con altri ratti, infatti una superficie divisoria tra le gabbie impediva agli animali di vedersi tra loro. In entrambe le condizioni sperimentali, gli animali avevano piena disponibilità di acqua e cibo(figura 1, 2).

Le condizioni di CA e CI sono state realizzate in stanze a temperatura di 23°C e con un ciclo di luce/ buio 12ore/12ore.

3.1.3 Incorporazione di [³⁵S]metionina nelle proteine sinaptosomali della corteccia cerebrale e ippocampo.

Per determinare la sintesi proteica, un'opportuna aliquota della frazione sinaptosomale è stata incubata a 37°C in un mezzo isototonico costituito da NaCl 90mM, CaCl₂ 1mM, KCl 3mM, MgCl₂ 2mM, Glucosio 1mM, Tris-Cl 30mM, (pH 7.5) (Ringer) e saccarosio 0.1 M, contenente 20 µCi/ml di [³⁵S]metionina (NEN, >1000 Ci/mmol). Dopo il periodo di incubazione, la misura della radioattività proteica è stata determinata su aliquote di 200 µl della miscela a cui sono state aggiunte 1 ml di TCA 10% contenente 1mg/ml di metionina e 2-3 gocce di BSA 1 mg/ml. Dopo circa 30 minuti a 4°C, il campione veniva centrifugato in una centrifuga Eppendorf (14000 rpm per 15'; 4°C). Il sopranatante, contenente la radioattività solubile, veniva eliminato mentre il sedimento proteico precipitato era sciolto in 0.5 ml NaOH 1N contenente 1 mg/ml di metionina (37°C, 30') e riprecipitato con 4 volumi di TCA 25%. Dopo circa 30' a 4°C il precipitato veniva filtrato su filtri GF/C Whitman e lavato con TCA 8% contenente metionina 1 mg/ml. I filtri erano asciugati con una lampada ad infrarossi e posti in fiale contenenti 5 ml di liquido di scintillazione. La misura della radioattività proteica era effettuata in uno spettrofotometro a scintillazione liquida con una efficacia del 90% circa.

Quando si inducevano variazioni ioniche del mezzo di incubazione si ottenevano cambiamenti significativi della pressione osmotica; per cui l'iso-osmolarità veniva ristabilita con l'aggiunta di saccarosio. Infatti, l'effetto della composizione ionica del mezzo sulla sintesi proteica è stato valutato incubando i sinaptosomi con un mezzo contenente concentrazioni variabili di sali o reso iso-osmolari con saccarosio 0.32M. La concentrazione intracellulare di ioni calcio è stata fatta variare aggiungendo al mezzo di incubazione gli ionofori A23187 e ionomicina e composti che legano il calcio; Bapta-AM, veratridina, trifluoroperazina(TFP), W7, tapsigargina(TG) inibitore della pompa del calcio del reticolo endoplasmico, e ioni che bloccano i canali del calcio; Cd⁺⁺ e Co⁺⁺. Nel caso del Bapta-AM(chelante del calcio) è stato necessario procedere ad una preincubazione di 15 minuti in presenza dell'inibitore, per permettere al composto di oltrepassare la membrana plasmatica. Una seconda preincubazione di 15 minuti è stata necessaria anche per il trattamento con RNAsi. In ogni esperimento è stata valutata l'inibizione da cicloesimide, inibitore della sintesi proteica citoplasmatica (CHX), e cloramfenicolo, specifico inibitore della sintesi mitocondriale (CAP). Negli esperimenti di shock osmotico i sinaptosomi sono stati incubati in un mezzo ipotonico ottenuto diluendo il Ringer 5 volte con Tris-Cl 310mM, (pH 7.4). La reazione di incorporazione è stata fatta partire per l'aggiunta di [³⁵S]metionina.

3.1.4 Analisi elettroforetica delle proteine sinaptosomali neosintetizzate nei ratti in CA e CI.

Le proteine sinaptosomali neosintetizzate sono state recuperate dalla miscela di incubazione per centrifugazione nel rotore SW55 di una ultracentrifuga Beckman (50000 rpm, 10 min, 4°C). Questa procedura ha permesso un recupero di circa il 100% delle proteine radioattive. Le proteine sedimentate sono state sciolte in 100 µl di un tampone (sample buffer: Tris-Cl 60 mM PH 6.8; SDS 2%; glicerolo 10%; blu di bromofenolo 0,01%; ditiotreitolo 100mM) utilizzato per il frazionamento elettroforetico. La quantità di campione da utilizzare nelle analisi SDS-PAGE è stata stabilita sulla base della radioattività di ciascun campione. In ogni pozzetto è stata caricata radioattività per un massimo di 10000 cpm e proteine per un massimo di 80-100 µg. In uno dei pozzetti del gel è stata inserita una miscela di proteine-¹⁴C di peso molecolare noto (Amersham; catena pesante della miosina, 200 kDa; fosforilasi B 94.7 kDa; albumina di siero bovino 68.0 kDa; ovalbumina 43.0 kDa; anidrase carbonica 29 kDa; β- lattoglobulina 18.4 kDa; lisozima 14.3 kDa).

Per visualizzare le bande proteiche radioattive, al termine della corsa elettroforetica, i gel sono stati sottoposti a fluorografia con EN³HANCE (NEN, Perkin Elmer), essiccati su un supporto di carta da filtro (90 min a 65 °C), ed esposti ad una lastra fotografica (Fuji) a -80 °C per un adeguato numero di giorni (da 7 a 15 giorni). Lo sviluppo delle lastre (LifeRay APS fixer e developer, Ferrania) ha consentito di esaminare la presenza di eventuali differenze nelle proteine sinaptosomali neosintetizzate.

I pesi molecolari delle bande elettroforetiche di interesse sono stati determinati costruendo una retta di taratura sulla base della mobilità relativa (distanza percorsa in mm) delle proteine a peso molecolare noto.

3.1.5 Analisi morfologiche

Per analizzare la possibilità che la terminazione nervose presinaptiche contengono un sistema di sintesi proteica locale abbiamo trasfettato, utilizzando un sistema di trasfezione basato sui lipidi (NeuroPorter Transfection Reagent, Gene Therapy Sistem, San Diego, CA, USA) la preparazione di sinaptosomi di cervello di ratto con un mRNA per la proteina fluorescente verde (GFP). Il prodotto di traduzione di GFP è stato precedentemente identificato grazie ad un western blot e utilizzando un anticorpo monoclonale di GFP coniugato alla HRP (perossidasi di Rafano; JL-8, diluizione 1:200; BD Biosciences Clontech). I sinaptosomi trasfettati sono stati posti su vetrini coperti di polilisina. Il prodotto di traduzione della proteina in esame veniva visualizzato grazie alla fluorescenza verde. La localizzazione del prodotto di traduzione è stata verificata utilizzando un anticorpo policlonale per un tipo di sinapsina, una proteina a specifica localizzazione presinaptica

(gentilmente offerta dal Dr. A.J.- Czernick (The Rockefeller University, NY, USA) coniugato alla rodamina che sviluppa un colore rosso. Il segnale verde emesso dalla GFP coincide con quello rosso ottenuto dalla rodamina coniugata alla sinapsina. Questi dati provano che le terminazioni nervose presinaptiche sono capaci di sintetizzare proteine

3.1.6 Saggio immunoenzimatico (EIA) per rilevazione del corticosterone nei ratti CI e CA

Il saggio che abbiamo utilizzato è un saggio immunologico di tipo competitivo per la determinazione quantitativa del corticosterone nei liquidi biologici. Tale saggio è stato effettuato al fine di calcolare la concentrazione di corticosterone in campioni di siero prelevati dai ratti del nostro laboratorio. A tale scopo il sangue raccolto è stato messo in tubi eparinizzati e centrifugato a 2000 rpm a 4°C per 30 minuti; infine è stato prelevato il sopranatante, che corrisponde al siero di nostro interesse.

Il kit per la rilevazione del corticosterone comprende specifici pozzetti il cui fondo è rivestito con anticorpi anti-IgG di pecora ai quali si legherà un anticorpo policlonale specifico per il corticosterone, anch'esso fornito dal kit. Inoltre sono inclusi uno standard di peso molecolare del corticosterone e del corticosterone coniugato covalentemente ad un enzima, la fosfatasi alcalina. Tale enzima, in seguito all'aggiunta di un adeguato substrato, catalizza una reazione che porta alla formazione di un prodotto di colore giallo. Il kit fornisce anche soluzioni quali l'Assay Buffer 15, utilizzato per le diluizioni, il Wash Buffer per i lavaggi e la Stop solution per bloccare la reazione enzimatica. Infine vi è anche lo Steroid Displacement Reagent, da aggiungere ai campioni per inibire eventuali legami di steroidi alle proteine: i campioni vengono diluiti con 2,5 parti di tale reagente per ogni 97,5 parti del campione.

In base al numero di campioni di cui si vuole conoscere la concentrazione di corticosterone, si sceglie un adeguato numero di pozzetti in duplicato. Alcuni pozzetti vengono utilizzati per effettuare un controllo interno del kit che ci permette di valutare la bontà dell'anticorpo, del coniugato alla fosfatasi alcalina e del substrato. Altri pozzetti, invece, vengono riempiti con 100 µl di corticosterone standard a 20000, 4000, 800, 160 e 32 pg/ml rispettivamente. Tale standard, essendo a concentrazione nota di corticosterone, mediante analisi spettrofotometrica, ci permette di costruire una retta di taratura. I restanti pozzetti vengono invece riempiti con il campione da saggiare. Sia nello standard che nei campioni si aggiungono: 50 µl di Assay Buffer 15, 50 µl di coniugato alla fosfatasi alcalina, 50 µl di anticorpo. Si effettua una prima incubazione per 2 ore su un agitatore a 500 rpm. Al termine di tale incubazione si eseguono 3 lavaggi con 400 µl di Wash

solution per allontanare i componenti in eccesso rimasti in soluzione. Ad ogni pozzetto si aggiungono 200 µl del substrato della fosfatasi alcalina. Si esegue quindi una seconda incubazione per 1 ora per . Infine si aggiungono 50 µl di una soluzione che blocca la reazione enzimatica. A questo punto si passa alla lettura spettrofotometrica a 405 nm. L'intensità del colore giallo è inversamente proporzionale alla concentrazione del corticosterone presente sia nel campione che nello standard. Dall'assorbanza dei campioni letta allo spettrofotometro, per estrapolazione sulla retta di taratura, si può risalire alla concentrazione precisa di corticosterone presente.

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione del sistema sinaptosomale di sintesi proteica.

L'incorporazione iniziale di [³⁵S]metionina è lineare nel tempo di incubazione e dipende dalla concentrazione proteica. Infatti, l'incorporazione dell'amoniacido aumenta linearmente fino a circa 40 minuti dopo dei quali la velocità di incorporazione tende diminuire (fig. 3A). Inoltre, la velocità di incorporazione dipende anche dalla concentrazione delle proteine sinaptosomali poste nel mezzo. Infatti, l'incorporazione aumenta linearmente fino alla concentrazione proteica di 250 µg/ml. A tempi più lunghi la velocità della reazione si riduce e ad incrementi di concentrazione proteica l'incorporazione procede molto più lentamente (fig. 3B). Pertanto, tutte le analisi sono state effettuate a concentrazioni proteiche e tempi di incubazione che non eccedevano le porzioni lineari delle rispettive curve.

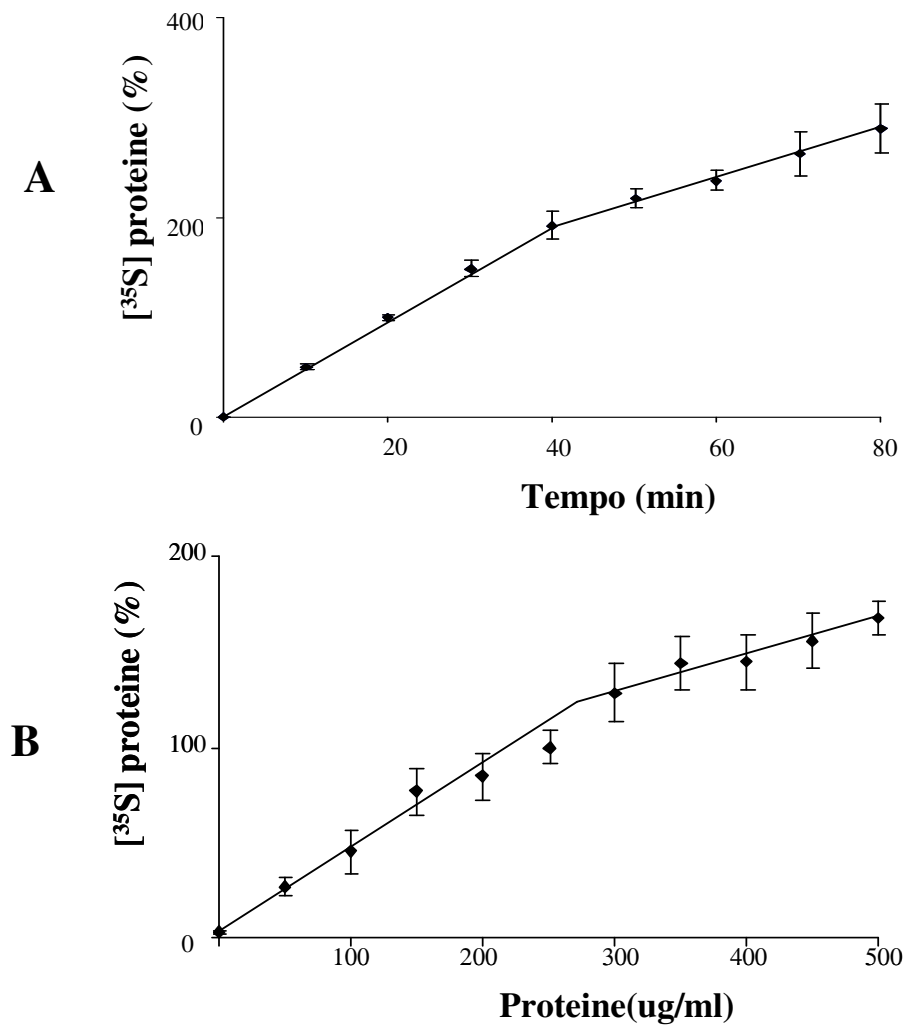


Figura 3: A) radioattività delle proteine di nuova sintesi espressa in percentuale in funzione del tempo di incubazione; B) radioattività delle proteine neosintetizzate in funzione della concentrazione delle proteine fredde incubate (frazione sinaptosomale)

Come ci si aspettava da un sistema di sintesi proteica racchiuso da membrana plasmatica osmoticamente sensibile, la preincubazione della frazione sinaptosomale in un mezzo ipotonico (vedi metodi) provoca una drastica perdita di incorporazione di [35 S]metionina nelle proteine (fig. 4A). Questo è dovuto ad un'entrata massiva di acqua nei sinaptosomi con il conseguente rottura e rilascio nel mezzo di tutti i suoi componenti solubili.

Se da un lato lo shock ipo-osmotico della frazione sinaptosomale elimina completamente l'attività di sintesi proteica, l'aggiunta della RNasi non modifica l'incorporazione di [35 S]metionina nelle proteine sinaptosomali neosintetizzate, in quanto l'enzima risulta incapace di superare la membrana plasmatica. Questi risultati confermano che la sintesi proteica sinaptosomale ha luogo in compartimenti racchiusi da una membrana plasmatica.

La reazione di sintesi proteica avviene senza l'aggiunta di fattori solubili o di composti ad elevato contenuto energetico, ad esempio ATP; pertanto il sistema in questione è in grado di sintetizzare proteine usando fonti endogene di energia e fattori presenti negli stessi sinaptosomi.

In presenza di inibitori specifici la sintesi proteica sinaptosomale rivela la sua natura in prevalenza eucariotica. Infatti, l'incorporazione dell'aminoacido radioattivo si riduce sensibilmente con l'aumentare della concentrazione di cicloesimide (CHX), uno specifico inibitore della sintesi proteica eucariotica e in minor misura dal cloramfenicolo (CAP), uno specifico inibitore della sintesi proteica mitocondriale (fig. 4A). Una più pronunciata inibizione è prodotta dalla puomicina (PUR), noto come uno specifico inibitore di entrambi i sistemi.

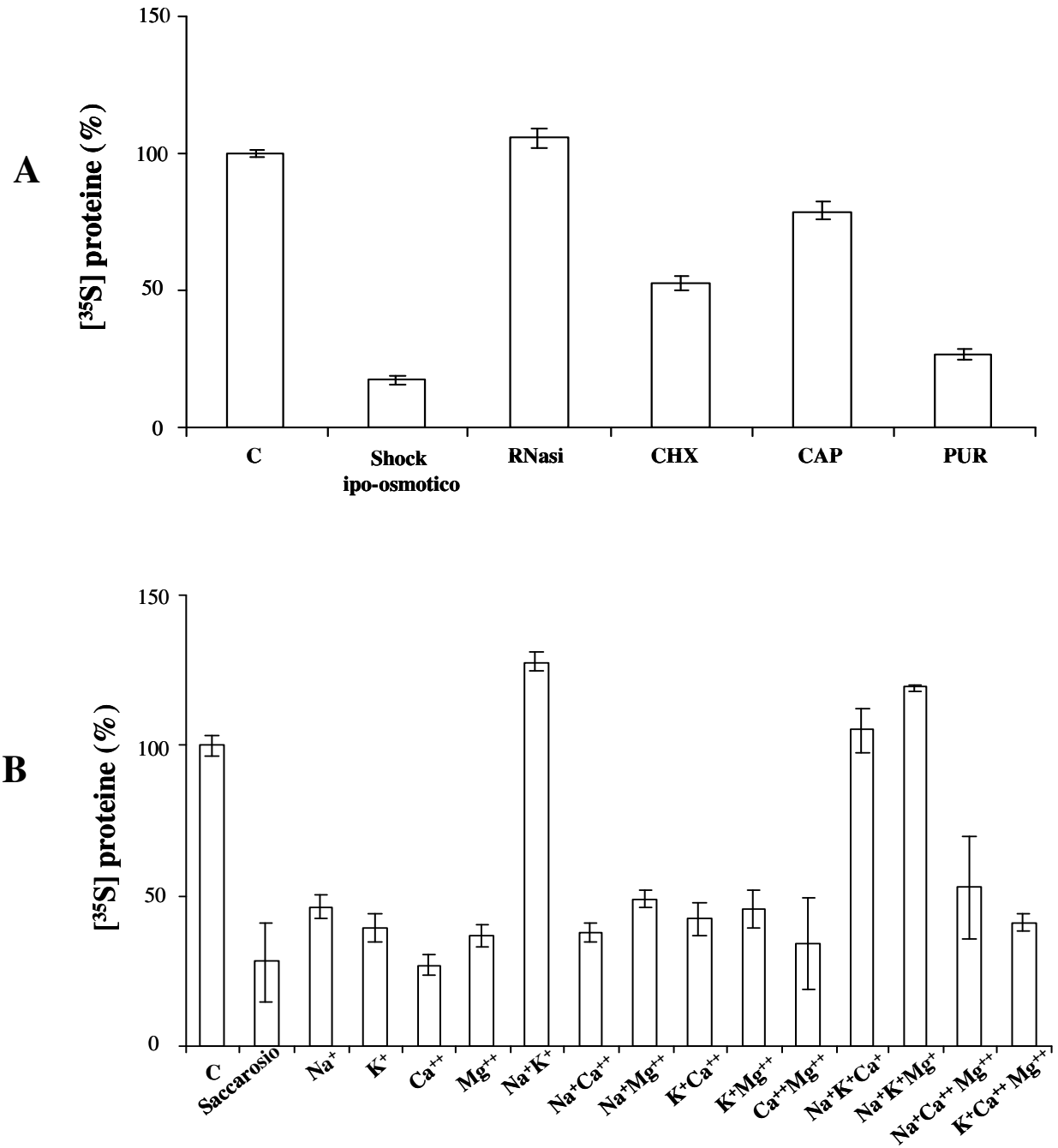


Figura 4: A) la percentuale di radioattività incorporata nelle condizioni di controllo(C), nello shock iposmotico, in presenza di RNAsi, di cicloesimide (CHX), di cloramfenicolo(CAP), e di puromicina (PUR), B) la percentuale di radioattività incorporata nelle condizioni di controllo(C), in presenza di saccarosio, degli ioni sodio, potassio, magnesio, calcio e delle loro combinazioni.

4.1.2 Dipendenza della sintesi proteica sulla composizione ionica del mezzo di incubazione

Il ruolo dei singoli ioni o della miscela degli stessi sulla sintesi proteica è stato esaminato aggiungendo nel mezzo di incubazione le stesse concentrazioni che avevano nella soluzione Ringer (vedi metodi). In questi esperimenti sono stati aggiunte nel mezzo opportune quantità di saccarosio per contrastare la diminuzione in osmolarità indotta dalla assenza di altri ioni. Come è mostrato in figura 4B, quando il mezzo di incubazione contiene solo saccarosio, o saccarosio con solo uno dei quattro ioni presenti nel Ringer, la velocità della incorporazione risulta essere sostanzialmente più bassa rispetto alle condizioni di controllo (Ringer). Infatti, in presenza di solo saccarosio, la radioattività diminuisce del 72% rispetto al controllo; i cationi aggiunti singolarmente nel mezzo causano un'inibizione della sintesi proteica. In particolare, nel caso dello ione Ca^{2+} l'inibizione è del 72% mentre nel caso dello ione Mg^{2+} è del 63%, per il K^{+} è del 61% e per lo ione Na^{+} è del 54%. Inoltre, con la combinazione di più ioni si osservava una radioattività maggiore di quella ottenuta in presenza dei singoli ioni (fig. 4B). Nella stessa figura, si può notare che la sola combinazione degli ioni Na^{+} e K^{+} non rispetta il comportamento generale; infatti la combinazione di questi due ioni produce un aumento della radioattività superiore a quelle della condizione di controllo (+28%). Inoltre, quando lo ione Ca^{2+} era aggiunto al mezzo che conteneva i due cationi monovalenti Na^{+} e K^{+} , l'incorporazione era maggiore rispetto alla condizione di controllo. Infine, con l'aggiunta dello ione Mg^{2+} in presenza dei due cationi monovalenti, la velocità di incorporazione era nettamente più alta del controllo (+19%). Inoltre, quando alla miscela di incubazione contenente tre ioni mancava uno dei ioni Na^{+} o K^{+} , la velocità di reazione rimaneva al di sotto del 50% del controllo. Questi dati indicano che la sintesi proteica sinaptosomale aumenta grazie alla simultanea presenza degli ioni Na^{+} e K^{+} , e che è parzialmente inibita dal Ca^{2+} e in minor misura dal Mg^{2+} . Ulteriori esperimenti sono stati condotti per determinare la dipendenza della velocità di incorporazione al variare della concentrazione di uno dei due cationi monovalenti. Si è notato che la completa mancanza dello ione sodio riduce la sintesi proteica del 69% rispetto al valore del controllo (90mM) (fig. 5A). Si è osservato che quando la concentrazione dello ione sodio aumentava progressivamente da 5 mM a 90 mM, la curva seguiva un andamento bifasico. Infatti, un primo aumento della radioattività si ha quando alla concentrazione di 5 mM rimanendo costante fino a 20 mM, mentre un secondo aumento si osserva quando la concentrazione di sodio raggiunge 40 mM rimanendo costante fino a 90 mM. In particolare, la velocità di incorporazione in presenza di sodio (ad una concentrazione di 5 mM) è ben 1.5 volte maggiore di quella registrata in assenza dello stesso ione (test di Student: $p < 0.05$). Questo aumento rimaneva costante quando la concentrazione raddoppiava (10 mM), ma aumentava ulteriormente a concentrazioni crescenti; a 20

mM di 1.9 volte, a 40 mM 2.3 volte, ed infine a 90 mM 3.2 volte rispetto al controllo. Con il test di Student , si è visto che la velocità di sintesi a 10 mM non era differente da quella che si è osservata a 20mM, mentre si ha un incremento significativo a 40 mM Na⁺ (p< 0.05) e a 90 mM Na⁺ (p < 0.0001).

Una andamento bifasico si è anche osservato con l'aumento della concentrazione dello ione potassio (fig. 5B). In un mezzo in assenza di potassio, l'attività di sintesi proteica era solo del 43% rispetto al controllo (concentrazione di 3 mM nella soluzione Ringer). L'attività di sintesi proteica era prossima al valore di controllo quando la concentrazione del potassio era di 1mM (94%) e rimaneva sostanzialmente la stessa a 5 mM (101%) e a 10 mM (105%). Dunque, le concentrazioni crescenti dello ione potassio aumentano la velocità di incorporazione che raggiunge addirittura un valore del 121% del valore del controllo ad una concentrazione di 20 mM (p<0.0001) ma che progressivamente declina a concentrazioni più alte.

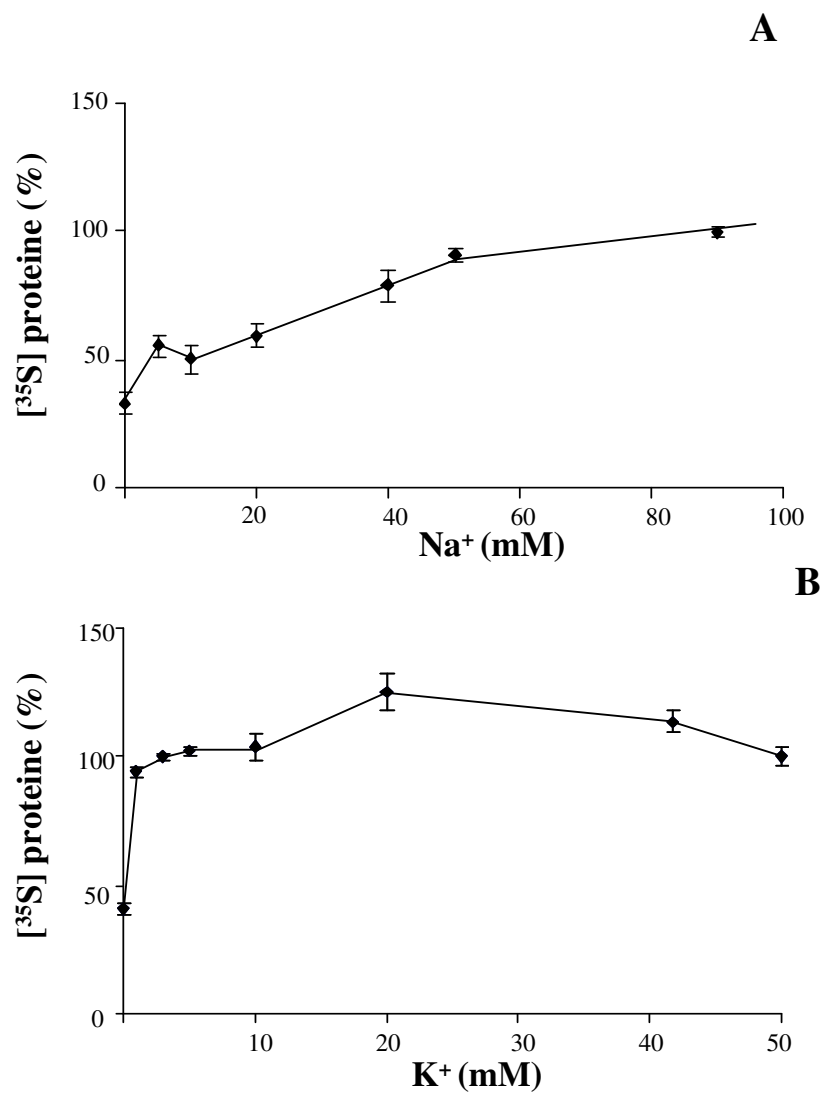


Figura 5: La percentuale di radioattività delle proteine neosintetizzate in funzione della concentrazione dello ione sodio (A) e potassio(B).

4.1.3 Effetto del livello citosolico del calcio sulla sintesi proteica sinaptosomale

Per indagare meglio sull'effetto inibitorio degli ioni calcio sull'incorporazione di [³⁵S]metionina, il livello intracellulare di tale ione è stato modificato ricorrendo all'uso di composti che agiscono sull'omeostasi del Ca⁺⁺. Gli stessi composti erano già stati utilizzati sui sinaptosomi del calamaro. La sintesi proteica dei sinaptosomi presinaptici di calamaro ha mostrato una forte dipendenza dal livello citosolico dello ione in questione, infatti il calcio produce un effetto inibitorio se vengono aumentati o diminuiti i suoi livelli fisiologici (Crispino et al., 1993; Benech et al., 1999). Per osservare se gli stessi effetti erano presenti anche nei mammiferi, i sinaptosomi di cervello di ratto sono stati incubati con un certo numero di modulatori citosolici del calcio, includendo gli ionofori del calcio A123187 e la ionomicina. Una progressiva inibizione della sintesi proteica si osserva con l'aumento della concentrazione dei singoli ionofori, raggiungendo per entrambi una sostanziale inibizione di circa 80% a 4μM per l'A123187, 2μM per la ionomicina (fig. 6). La velocità di incorporazione diminuisce con un aumento della concentrazione di A23187 (fig. 6A) seguendo un pattern monofasico, mentre con un aumento della concentrazione di ionomicina la velocità di incorporazione mostra un pattern bifasico (fig. 6B). Infatti, a concentrazioni di ionomicina 0.25μM e 0.5 μM l'inibizione rimaneva la stessa (34% e 35% rispettivamente). D'altro canto, a concentrazioni più alte di ionomicina (0.8μM) il livello di inibizione aumenta marcatamente (69%), mentre rimane essenzialmente immutato a concentrazioni ulteriormente più elevate (61% a 1μM, 74% a 2μM). Le velocità di incorporazione a 1μM e 2μM risultano significativamente differenti rispetto a quelle a 0.25μM e 0.5μM, ($p < 0.0001$).

Risposte bimodali sono state osservate quando i sinaptosomi erano esposti a concentrazioni crescenti dei modulatori del calcio, come BAPTA-AM e W7, che sono conosciuti come composti che diminuiscono il livello del calcio citosolico, o come la taspargina che induce l'effetto opposto (fig. 7). Poiché il BAPTA-AM richiede del tempo per attraversare la membrana plasmatica, il suo effetto sulla sintesi proteica era valutato preincubando i sinaptosomi per 15 minuti a 37°C al buio (vedi metodi). La figura 7 mostra che alla concentrazione di 1μM di BAPTA-AM si ha un'inibizione significativa del 26% della sintesi proteica che rimane essenzialmente la stessa a 2μM e 4μM (29% e 32% rispettivamente). I valori dell'inibizione aumentano solo a concentrazioni più elevate; infatti a 20μM l'inibizione risulta del 79%.

Un'altra risposta bimodale è mostrata in figura 7 B dal W7, inibitore della calmodulina. Un'inibizione significativa si ha quando il composto raggiunge nel mezzo una concentrazione di 6μM (23%), e non varia a 10μM (24%) ma aumenta progressivamente ad alte concentrazioni (38%

a 25 μ M, 79% a 50 μ M). Un altro inibitore della calmodulina, la trifluoperazide(TFP) mostra un'inibizione iniziale del 5% che rimane costante a 5 μ M e 25 μ M (figura 7C). Un drastico aumento dell'inibizione si raggiunge ad alte concentrazioni del composto, (68% a 200 μ M). Quando la concentrazione fisiologica del calcio aumenta con l'aggiunta nel mezzo della tapsigargina, un inibitore della pompa del calcio del reticolo endoplasmatico, si osserva una significativa inibizione già a 2 μ M (fig. 7D, 21%; test di Student. $p < 0.0001$), ma che non aumentava a 5 μ M e 10 μ M (23% e 26%, rispettivamente). Solo concentrazioni maggiori si osservava un'alta inibizione (59% a 50 μ M). Inoltre, la curva dose-risposta della veratridina, un composto che aumenta il livello citosolico del calcio, non segue un pattern bifasico (fig. 8A).

Infine, è stato osservato l'effetto di due altri ioni; il cobalto e il cadmio. Nella sintesi proteica sinaptosomale di calamaro questi due ioni mostrano effetti contrastanti (dati non pubblicati). In particolare entrambi inibiscono i canali del calcio (Hille, 1992), ma dei due solo il cadmio mostra un effetto inibitorio sulla sintesi proteica sinaptosomale di calamaro. Infatti, un aumento della concentrazione dello ione cadmio induce nei sinaptosomi di cervello di ratto una forte inibizione della radioattività seguendo un pattern monobasico (fig. 8B; 80% a 2 μ M, 92% a 8 μ M). D'altro canto, un aumento della concentrazione dello ione cobalto induce un'iniziale attivazione della velocità di incorporazione che è infatti presente già a 0.2 mM (+17%) e che raggiunge un massimo a 2 mM e a 4 mM (+28%) (fig.8C).

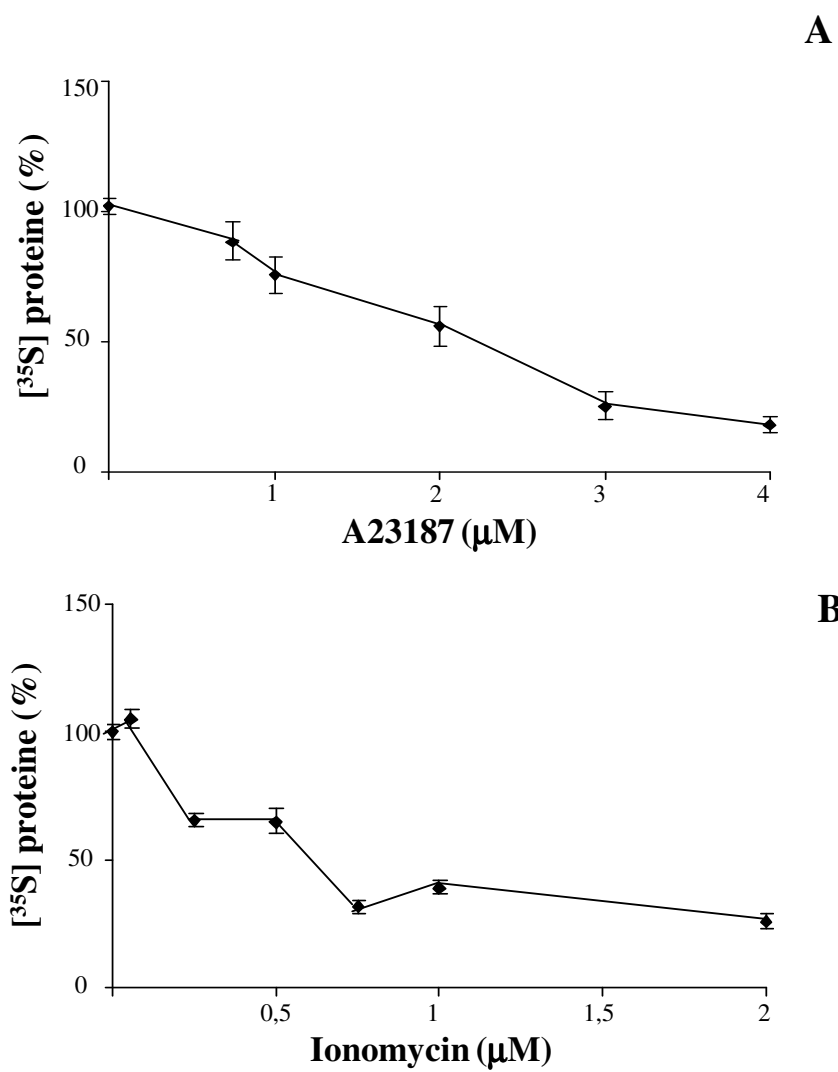


Figura 6: la percentuale di radioattività delle proteine neosintetizzate in funzione della concentrazione degli ionofori del calcio A23187 (A) e ionomicina (B).

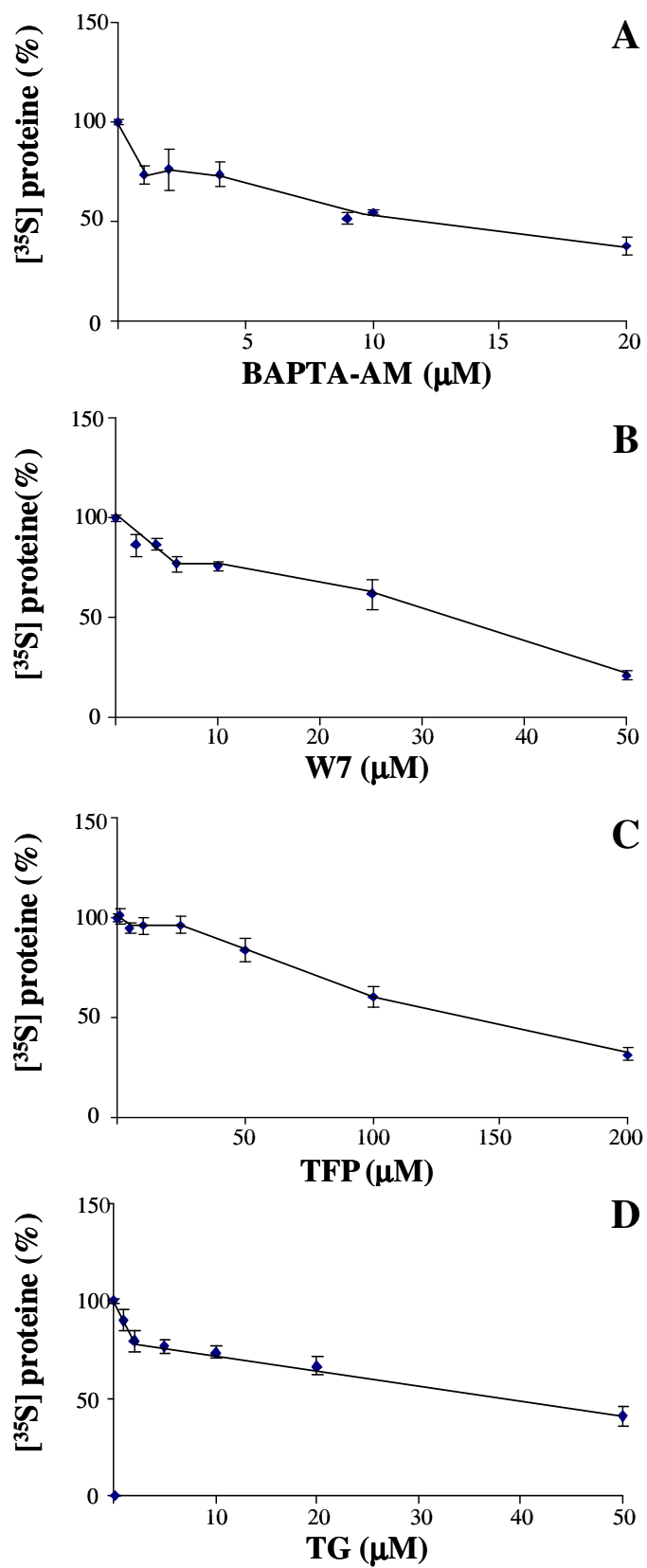
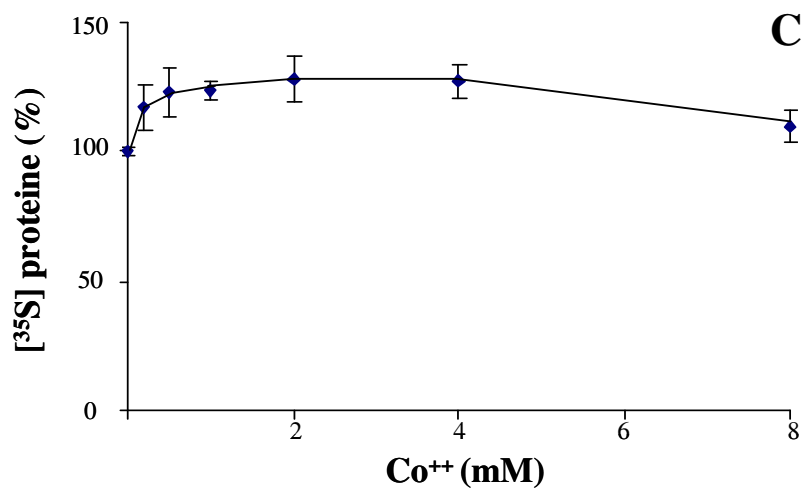
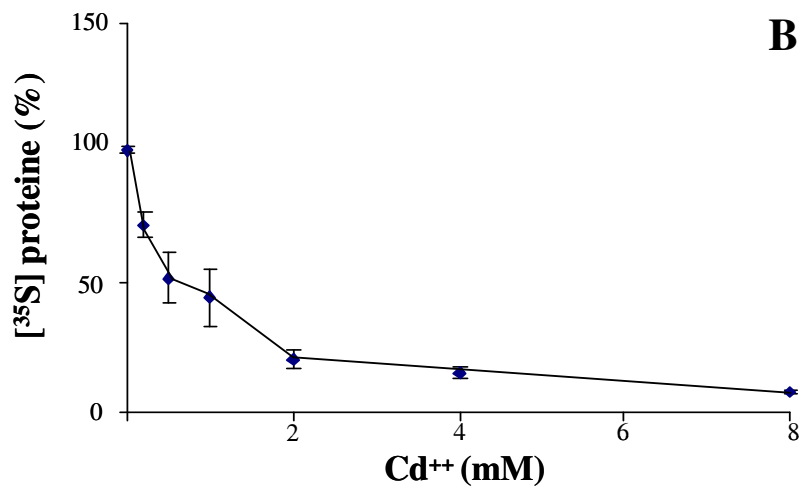
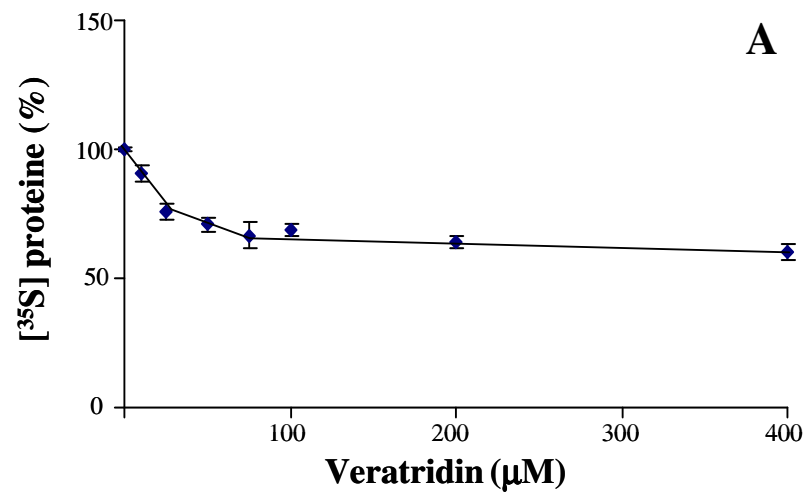


Figura 7: La percentuale di radioattività delle proteine di nuova sintesi espressa in percentuale in funzione della concentrazione dei modulatori del calcio; BAPTA-AM (A), W7(B), trifluoroèperazide(TFP)(C), tapsigargina(TG) (D).



i

Figura 8: La percentuale di radioattività delle proteine di nuova sintesi espressa in percentuale in funzione della concentrazione; veratridina(A), cadmio(B), cobalto(C)

4.1.4 Effetto degli inibitori della sintesi proteica sulle curve bifasiche dose-risposta

I profili bifasici delle curve dose/effetto dei composti su descritti, suggeriscono la presenza di sistemi multipli di sintesi proteica sinaptosomale che potrebbero essere dovuti alla coesistenza dei sistemi mitocondriali e citoplasmatici. Per confermare tale ipotesi, le curve bifasiche degli ioni e dei composti sono state esaminate in condizione di completa inibizione della sintesi proteica mitocondriale. Questi esperimenti, infatti, sono stati eseguiti aggiungendo nel mezzo di incubazione 20µg/ml di cloramfenicolo. Dalla figura 9 si può osservare che le curve degli ioni sodio e potassio, del BAPTA-AM o della taspigargina rimangono pressoché invariate in presenza di cloramfenicolo. Questi risultati appoggiano l'ipotesi che la frazione sinaptosomale di cervello di ratto possiede oltre ad un sistema di sintesi mitocondriale anche ben due sistemi separati di sintesi proteica di natura citoplasmatica presinaptica e postsinaptica.

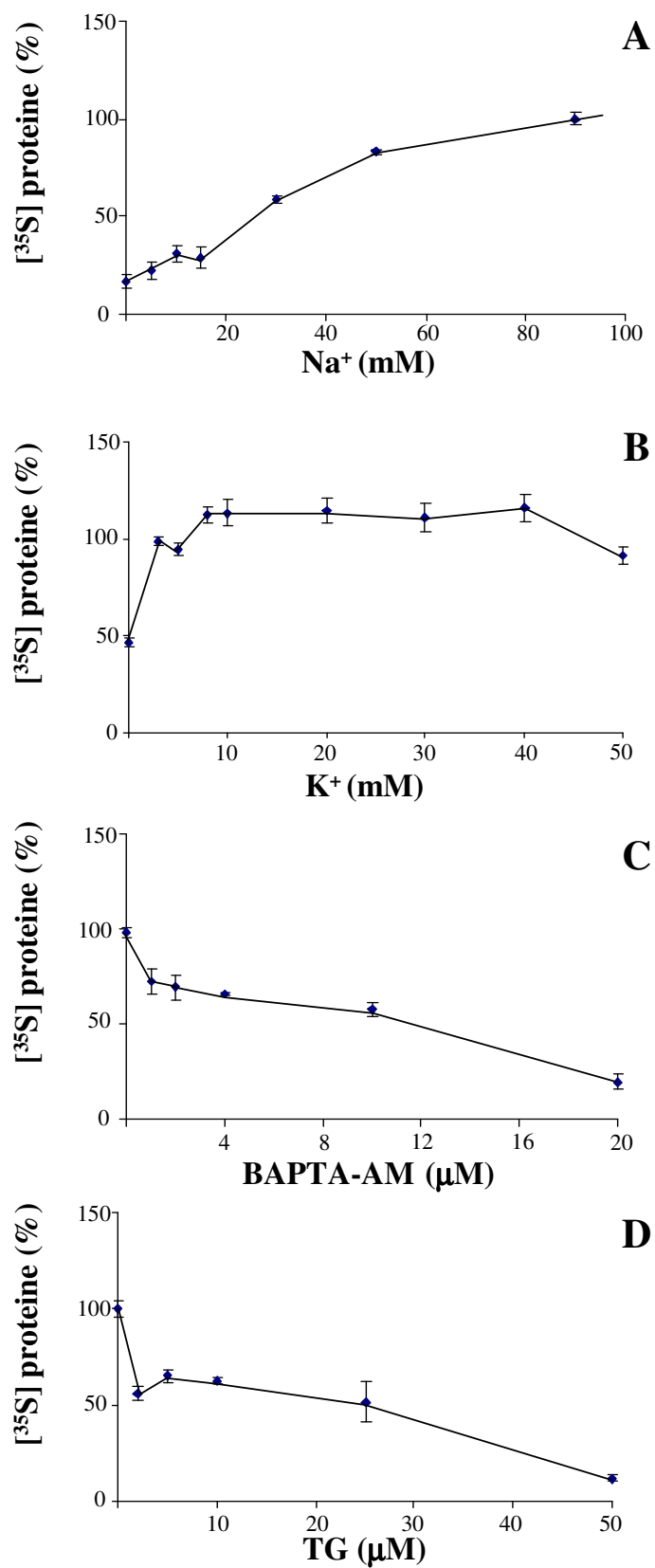


Figura 9: Effetto della sintesi proteica in presenza di cloramfenicolo; la percentuale di radioattività delle proteine neosintetizzate in funzione della concentrazione dello ione sodio (A), potassio(B), BAPTA-AM (C), tapsigargina(TG) (D).

4.1.5 Risultati dell'analisi morfologica

Dati preliminari sulla localizzazione di un sistema di sintesi proteica presinaptica sono stati ottenuti trasfettando la frazione sinaptosomale con mRNA di GFP adoperando la stessa procedura utilizzata con successo nei sinaptosomi di calamaro (Gioio et al., 2004). In figura 10 sono mostrati i prodotti di traduzione che si possono osservare nei sinaptosomi 30-60 minuti dopo la trasfezione (promotore T7). La trasfezione dell'antisense dell'mRNA di GFP serve come controllo negativo. In figura 10 B si osserva il segnale rosso della rodamina, coniugata a un anticorpo contro la sinapsina, marker proteico della terminazione presinaptica. Infine, in figura 10 C si osserva che la maggior parte del segnale verde fluorescente della GFP coincide con il segnale rosso della rodamina. La colocalizzazione di buona parte dei siti fluorescenti con l'anticorpo ha dimostrato che uno di questi sistemi è certamente di natura presinaptica.

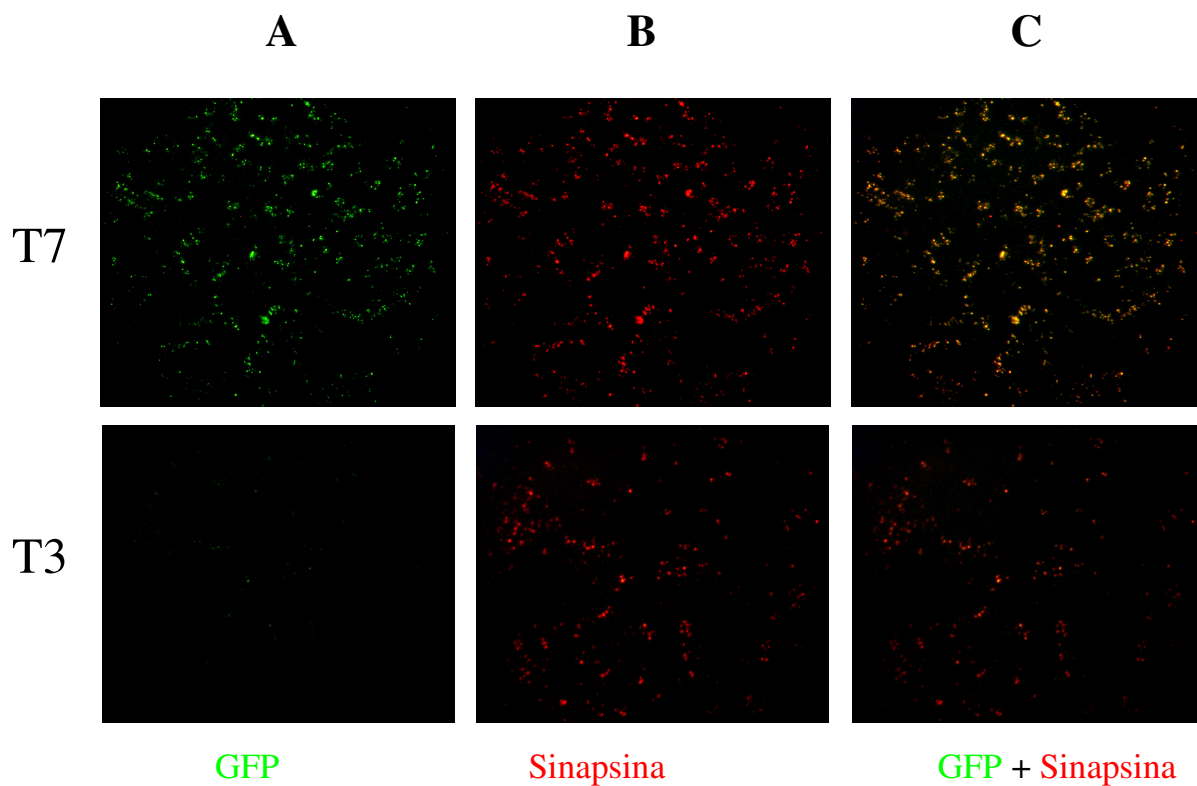


Figura 10: I sinaptosomi traducono un mRNA per la GFP. L'mRNA della GFP (T7) è introdotto nei sinaptosomi in vitro, usando una metodologia di trasfezione basata sui lipidi e la sintesi della GFP è monitorata da una fluorescenza. Un RNA per la GFP (T3) è usato come controllo negativo. La rodamina coniugata ad un anticorpo contro la sinapsina è utilizzata per visualizzare le terminazioni nervose presinaptiche.

4.2 Risultati arricchimento

4.21. Analisi biochimiche

Dall'analisi dei valori medi di attività specifica nei ratti CA e CI è stato riscontrato che nei ratti CA l'attività specifica media è 477.7 cpm/ μ g, mentre nel secondo gruppo è 271.8 cpm/ μ g. Tale differenza è statisticamente significativa (test di Student $p < 0.05$). Quindi si può concludere che l'esperimento di arricchimento sensoriale ha indotto nei ratti CA un aumento significativo dell'attività di sintesi proteica sinaptosomale (Figura 11).

4.2.2 Risultati del test del corticosterone nei ratti CA e CI

Per valutare se l'incremento dell'attività specifica è dovuto esclusivamente all'arricchimento sensoriale ed escludere un eventuale influenza di un stato di stress nei ratti, sono stati misurati i livelli di corticosterone nel siero dei ratti dei gruppi CI e CA. Il corticosterone è, infatti, un ormone glucocorticoide prodotto dalla corteccia del surrene che tende ad aumentare nei ratti in situazioni di stress. E' stato effettuato un saggio EIA sui campioni di entrambi i gruppi di ratti. Dall'analisi dei risultati(media e deviazione standard dei valori ottenuti) è emerso che non c'è alcun aumento significativo dei livelli di corticosterone nei ratti CA rispetto a quelli CI; infatti i livelli di tale ormone (nei ratti CA è 242.99 pg/ml; nei ratti CI è 220.46 pg/ml), risultano essere quasi uguali (figura 12).

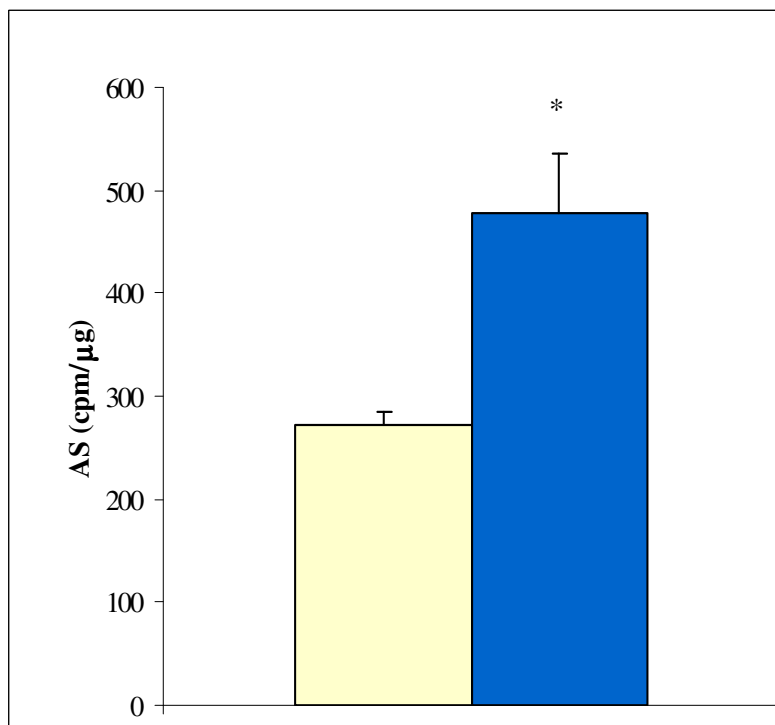


Figura 11: valori medi ed errore standard dell'attività specifica dei sinaptosomi dei ratti appartenenti ai gruppi CI ■ e CA ■ $p < 0,05$ (test t student).

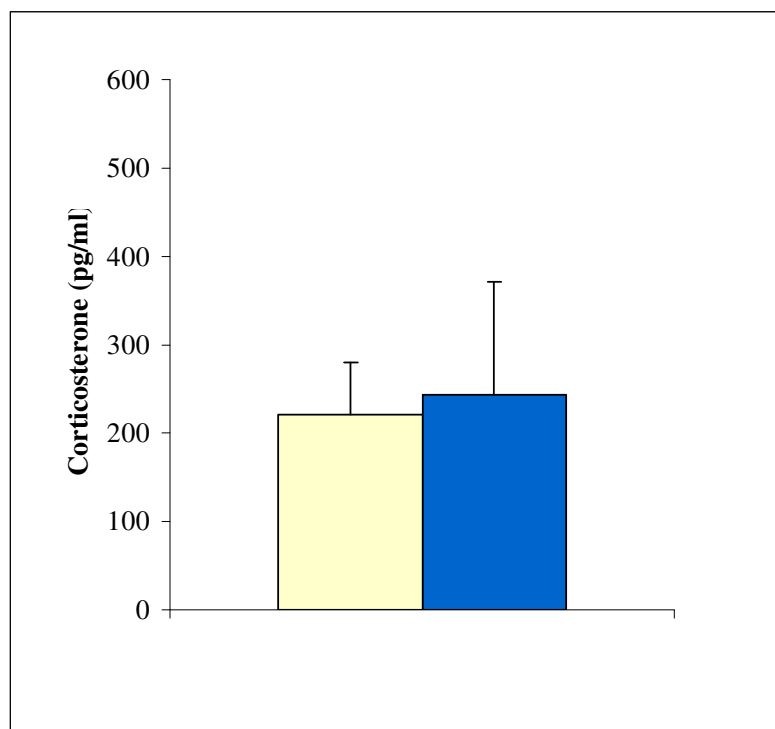


Figura 12: valori medi e deviazione standard della concentrazione di corticosterone nel siero dei ratti appartenenti ai gruppi CI ■ e CA ■.

4.2.3 Confronto del profilo elettroferetico dei ratti CA e CI

Le proteine neosintetizzate sono state separate per SDS-PAGE e visualizzate per fluorografia. Dall'esame visivo dei singoli profili delle due condizioni sperimentali (CA e CI) non si evidenziano differenze nei tipi e quantità delle varie bande proteiche (figura 13). Pertanto, l'incremento dell'attività globale della sintesi proteica non sembra riguardare specifiche proteine.

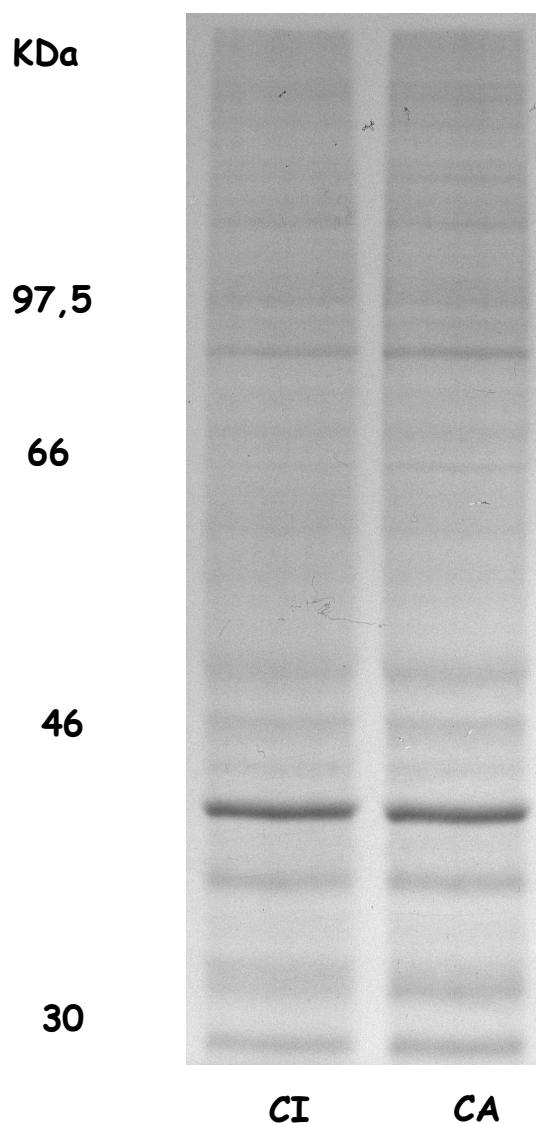


Figura 13: Confronto del profilo elettroforetico delle proteine radioattive neosintetizzate nei sinaptosomi dei ratti del gruppo CI e dei ratti del gruppo CA

5. Conclusioni

I dati di questa tesi confermano ed estendono le precedenti scoperte (per rassegna Whittaker 1993, Alvarez et al., 2000) che indicano che nel ratto la sintesi proteica sinaptosomale:

- è localizzata in strutture racchiusa da una membrana plasmatica: la sua attività di sintesi è sensibile ad un shock ipo-osmotico ed è insensibile all'azione della RNAsi
- è dovuta all'attività dei sistemi di sintesi proteica citoplasmatica ed mitocondriale
- è fortemente modulata dalla composizione ionica del mezzo di incubazione; richiede la presenza simultanea della concentrazione fisiologica dello ione sodio e potassio, mentre risulta inibita dallo ione calcio ed in minor misura dello ione magnesio.

Inoltre, si è avuta una prima evidenza che la sintesi proteica sinaptosomale è modulata dalla concentrazione degli ioni calcio, come era stata precedentemente dimostrato nei sinaptosomi presinaptici dei lobi ottici di calamaro. Infatti la massima velocità della sintesi proteica si ha quando nel mezzo di incubazione è presente una concentrazione basale dello ione calcio citosolico; una diminuzione od un aumento di tale concentrazione (ottenuta con l'uso di diversi tipi di modulatori dello ione in questione) determina l'inibizione della sintesi proteica. Di grande interesse è stato l'effetto stimolatore degli ioni monovalenti e l'effetto inibitorio dei modulatori del calcio in quanto mostrano curve dose/effetto con un pattern bifasico. Questi dati riflettono una caratteristica intrinseca della frazione sinaptosomale di ratto; ossia la presenza di sistemi multipli di sintesi proteica che differiscono tra loro per la diversa sensibilità alle concentrazioni dei cationi monovalenti e dei modulatori del calcio. E' noto che i sinaptosomi contengono sistemi di sintesi proteica sia citoplasmatica che mitocondriale e quindi le curve dose/effetto bimodali potrebbero essere interpretate ammettendo una diversa sensibilità di questi due sistemi intrasinaptosomali. Ma alcune osservazioni non sono d'accordo con questa interpretazione. In primo luogo la maggior parte dei modulatori del calcio mostrano le curve bifasiche, ma gli stessi modulatori usati negli esperimenti sui sinaptosomi di lobo ottico di calamaro non mostrano alcuna risposta bimodale (Bennech et al., 1999) anche se i sinaptosomi di calamaro possiedono entrambi i sistemi di sintesi proteica. Inoltre, gli effetti dovuti agli ioni sodio e potassio sono chiaramente spiegati grazie alla loro interazione con i componenti della membrana plasmatica sinaptosomale; come la pompa sodio potassio che modula la sintesi proteica sia nel ratto (Appel et al., 1969; Verity 1972, Verity et al. 1979) sia nei sinaptosomi di calamaro (Bennech et al., 1999). Queste interazioni non riguardano la modulazione del sistema di sintesi proteica intrasinaptosomale di natura mitocondriale. Di conseguenza le risposte bimodali dei sinaptosomi di ratto non possono essere attribuite alla presenza intrasinaptosomale dei sistemi di sintesi proteica mitocondriale e citoplasmatica. Infatti, i

dati indicano che, nel cervello di ratto la sintesi proteica sinaptosomale riflette l'attività di più di un sistema di sintesi proteica ma di natura citoplasmatica, presumibilmente a localizzazione presinaptica e postsinaptica. Queste conclusioni non sono in accordo con le recenti opinioni che prevedono una esclusiva attribuzione della sintesi proteica alle strutture postsinaptiche. Invece sembrerebbe più logico che tutti gli elementi presinaptici, postsinaptici e gliali contribuiscano alla sintesi proteica sinaptosomale. I rispettivi contributi non sono ancora stati determinati, ma essi sono chiaramente dipendenti dalla regione cerebrale, stadio di sviluppo ed eventi plastici. Per verificare e stabilire i singoli ruoli dei componenti sinaptici occorre effettuare altri esperimenti considerando sia una condizione di base sia una condizione di plasticità neuronale. In particolare l'obiettivo è quello di esaminare, uno per volta, l'attività di un solo sistema di sintesi proteica citoplasmatica grazie alla selezione delle concentrazioni degli ioni monovalenti o dei modulatori del calcio. Se l'ipotesi è giusta, le proteine neosintetizzate, sotto le suddette condizioni, dovrebbero mostrare patterns differenti.

Dati preliminari hanno dimostrato l'esistenza di un sistema di sintesi proteica sinaptosomale nelle strutture presinaptiche. Infatti, si è proceduto ad incubare la frazione sinaptosomale con l'mRNA della proteina fluorescente verde e ad esaminare la localizzazione del prodotto verde fluorescente di traduzione utilizzando un anticorpo contro la sinapsina (marker proteico presinaptico). La colocalizzazione di buona parte dei siti fluorescenti con l'anticorpo ha dimostrato che uno di questi sistemi citoplasmatici è certamente di natura presinaptica. Questi dati supportano l'ipotesi che la frazione sinaptosomale di corteccia di ratto contiene componenti multipli e che le terminazioni nervose contribuiscono significativamente all'attività di sintesi proteica.

Infine, si è studiato il coinvolgimento di tale sistema di sintesi sulla plasticità neuronale. Infatti, esperimenti di arricchimento sensoriale hanno indotto nei ratti CA un aumento significativo dell'attività di sintesi proteica sinaptosomale, e tale aumento è statisticamente differente nei ratti CA rispetto ai ratti CI. Questa variazione dell'attività di sintesi riguarda particolari regioni; corteccia e ed ippocampo, che sono proprio quelle in cui avvengono l'elaborazione delle informazioni (ippocampo) e l'immagazzinamento dell'esperienza nella memoria (corteccia).

Infine, dall'analisi dei livelli di corticosterone nel siero dei ratti posso concludere che l'aumento dell'attività di sintesi proteica sinaptosomale non è dovuto allo stress generato nell'animale dal protocollo di arricchimento, ma dipende specificamente dall'esperienza a cui gli animali sono stati sottoposti.

Quindi, si può quindi concludere che grazie alla sintesi proteica sinaptica possiamo osservare le variazioni della plasticità neuronale nel cervello dei mammiferi in seguito ad un'esperienza o un apprendimento.

La notevole rilevanza scientifica di questi risultati riguarda soprattutto il radicale cambiamento di prospettiva che essi suggeriscono nello studio della biologia del neurone. Infatti, i dati mostrati in questa tesi sottolineano infatti la relativa autonomia delle regioni neuronali periferiche nel mantenimento e nella plasticità di quegli stessi domini. In questa nuova prospettiva le modifiche plastiche legate a situazioni fisiologiche (sviluppo, apprendimento, invecchiamento, sonno, ecc) o patologiche (demenze, neuropatie degenerative, ischemia cerebrale, ecc) potrebbero essere facilmente studiate utilizzando come sistema modello la frazione sinaptosomale di cervello di ratto.

6. Bibliografia

- Alvarez, J., Torres, J.C. (1985) Slow axoplasmic transport: a fiction? *J. Theor. Biol.* **112**: 627-651
- Alvarez, J., Giuditta, A. & Koenig, E. (2000). Protein synthesis in axons and terminals: significance for maintenance, plasticity and regulation of phenotype. With a critique of slow transport theory. *Progr. Neurobiol.* **62**, 1-62
- Appel SH, Autilio L, Festoff BW, and Escueta AV. (1969). Biochemical studies of synapses *in vitro*. III. Ionic activation of protein synthesis. *J Biol Chem* **244**, 3166-3172.
- Autilio, L.A., Appel, S.H., Pettis, P., Gambetti, P.L. (1968). Biochemical studies of synapses *in vitro*. Part I: Protein synthesis. *Biochem J*: 2615-2622.
- Baas, P.W. and Brown, A. (1997) Slow axonal transport: the polymer transport model. *Trends Cell Biol.* **7**: 380-384
- Beaumont V et al. (2001). Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation. *Neuron* **23**: 389-401.
- Benech, J.C., Crispino, M., Kaplan, B.B., Giuditta, A. (1999) Protein synthesis in presynaptic endings of the squid brain: modulation by calcium ions. *J. Neurosci. Res* **55**: 776-781
- Bittner G.D. (1991) Long term survival of anucleate axons and its implications for nerve regeneration. *Trends in Neurosci* **14**: 188-193
- Bleher, R., and Martin, R. (2001) Ribosomes in the squid giant axon. *Neuroscience* **107**: 527-534
- Casadio A et al. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell* **99**: 213-157.
- Chun, J.T., Gioio, A.E., Crispino, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (1995) Characterization of squid enolase mRNA: sequence analysis, tissue distribution, and axonal localization. *Neurochem. Res* **20**: 923-930
- Chun, J.T., Gioio, A.E., Crispino, M., Eyman, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (1997) Molecular cloning and characterization of a novel mRNA present in the squid giant axon. *J. Neurosci. Res* **49**: 144-153.
- Cotman, C.W., Taylor, D.A. (1971) Autoradiographic analysis of protein synthesis in synaptosomal fraction. *Brain Res* **29**: 366-372.
- Crispino, M., Castigli, E., Perrone Capano, C., Martin, R., Menichini, E., Kaplan, B.B., & Giuditta, A. (1993a) Protein synthesis in a synaptosomal fraction from squid brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **4**: 276-284.
- Crispino, M., Perrone Capano, C., Kaplan, B.B., & Giuditta, A., (1993b). Neurofilaments proteins are synthesized in nerve endings from squid brain. *J. Neurochem.* **61**: 1134-1136.
- Crispino, M., Kaplan, B.B., Martin, R., Alvarez, J., Chun, J.T., Benech, J.C., & Giuditta, A. (1997). Active polysomes are present in the large presynaptic endings of the synaptosomal fraction from squid brain. *J. Neurosci.* **9**: 7694-7702.
- Crispino, M., Perrone Capano, C., Aiello, A., Iannetti, E., Capello, A., & Giuditta, A. (2001) Messenger RNAs in synaptosomal fractions from rat brain. *Mol. Brain Res.* **97**: 91-96.
- Cuttillo, V., Montagnese, P., Gremo, F., Casola, L. & Giuditta, A. (1983). Origin of axoplasmic RNA in the squid giant fibre. *Neurochem. Res.* **8**, 1621-1634
- Edström, A. (1969). Sedimentation analysis of ribonucleic acid extracted from isolated Mauthner nerve fibre components. *J. Neurochem.* **16**, 53-66.
- Eyman, M., Crispino, M., Kaplan, B.B. & Giuditta, A. (2003). Squid photoreceptor terminals synthesize calexcitin, a learning related protein. *Neurosci. Lett.* **347**, 21-24.

- Gambetti, P.L., Autilio-Gambetti, L.A., Gonatas, N.K., Shafer, B., (1972). Protein synthesis in synaptosomal fractions, Ultrastructural radioautographic study. *J. Cell Biol* **52**: 526-535.
- Gioio, A.E., Chun, J.T., Crispino, M., Capano, C.P., Giuditta, A. Kaplan, B.B. (1994) Kinesin mRNA is present in the squid giant axon. *J. Neurochem* **63**: 13-18
- Gioio, A.E. et al. (2001). Local synthesis of nuclear-encoded mitochondrial proteins in the presynaptic nerve terminal. *J. Neurosc. Res.* **64**, 447-453.
- Gioio, A.E., Lavina, Z.S., Jurkovicova, D., Zhang, H., Eyman, M., Giuditta, A., Kaplan B.B. (2004). Nerve terminals of squid photoreceptor neurons contain a heterogeneous population of mRNAs and translate a transfected reporter mRNA. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 865-872.
- Giuditta, A., Dettbarn, W.D. & Brzin M. (1968). Protein synthesis in the isolated giant axon of the squid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**, 1284-1287.
- Giuditta, A., D'Udine, B. & Pepe, M. (1971). Uptake of protein by the giant axon of the squid. *Nature New Biol.* **229**, 29-30.
- Giuditta, A., Metafora, S., Felsani, A., Del Rio, A. (1977) Factors for protein synthesis in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurochem* **11**: 1393-1395
- Giuditta, A., Cupello, A. & Lazzarini, G. (1980). Ribosomal RNA in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurochem.* **34**, 1757-1766.
- Giuditta, A., Hunt, T., Santella, L. (1986) Messenger RNA in squid axoplasm. *Neurochem. Intern.* **8**: 336-433.
- Giuditta, A., Manichini, E., Perrone Capano, C., Langella, M., Martin, R., Castigli, E., Kaplan B.B. (1991). Active polysomes in the axoplasm of the squid giant axon. *J. Neurosc. Res.* **26**, 18-28.
- Giuditta, A., Eyman, M. & Kaplan, B.B. (2002). Gene expression in the squid giant axon: neurotransmitter modulation of RNA transfer from periaxonal glia to the axon. *Biol. Bull.* **203**, 189-190.
- Giuditta, A., Kaplan, B.B., van Minnen, J., Alvarez, J. & Koenig, E. (2002). Axonal and presynaptic protein synthesis: new insights into the biology of the neuron. *Trends Neurosci.* **25**, 400-404.
- Grafstein, B. & Forman, D.S. (1980). Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.* **60**, 1167-1283.
- Henn, F. A., Anderson, D.J., Rustad, D.G., (1976). Glial contamination of synaptosomal fraction. *Brain RES* **101**:341-344.
- Ingoglia, N.A., Giuditta, A., Zanakakis, M. F., Babigian, A., Tasaki, I., Chakraborty, G., Sturman, J., (1983). Incorporation of ³H-amino acids into proteins in a partially purified fraction of axoplasm: evidence for transfer RNA mediated, post-translational protein modification in squid giant axon. *J. Neurosci.* **3**, 2463-2473.
- Jimenez, C.R., Eyman, M., Lavina, Z.S., Gioio, A.E., Li K.W., van der Schors, R.C., Gerearts, W.P., Giuditta, A., Kaplan, B.B., van Minnen, J. (2002). Protein synthesis in synaptosomes: a proteomic analysis. *J. Neurochem.* **81**, 735-744.
- Jirikowsky, G.F., Sanna, P.P., Bloom, F.E. (1990) mRNA coding for oxytocin is present in axons of hypothalamo-neurohypophyseal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 7400-7404
- Kandel E.R., (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Scienze* **294**:1030-1038.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2003) *Principi di Neuroscienze*.
- Kang H, Shuman EM (1996) A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* **273**: 1312-1316.
- Kaplan, B.B., Gioio, A.E., Perrone Capano, C., Crispino, M., Giuditta, A. (1992) β -actin and β -tubulin are components of heterogeneous mRNA population present in squid giant axon. *Mol. Cell. Neurosci* **3**: 133-144.
- Koenig, E. (1979) Ribosomal RNA in Mauthner axon: implications for a protein synthesizing machinery in myelinated axons. *Brain Res* **175**: 95-107

- Koenig, E. (1984) Local synthesis of axonal protein. In: Laitha, A. (Ed.), Handbook of Neurochemistry vol. 7. Plenum, New York, pp. 315-340.
- Koenig, E. (1991) Evaluation of local synthesis of axonal proteins in the goldfish Mauthner cell axon and axons of dorsal and ventral roots of the rat brain. *Mol. Cell. Neurosci* **2**: 384-394
- Koenig, E. & Martin, R. (1996). Cortical plaque-like structures identify ribosome-containing domains in the Mauthner cell axon. *J. Neurosci.* **16**, 1400-1411.
- Koenig, E. & Giuditta, A. (1999). Protein synthesizing machinery in the axon compartment. *Neurosci.* **89**, 5-15.
- Koenig, E., Martin, R., Titmus, M. & Sotelo-Silveira, J.R. (2000). Cryptic peripheral ribosomal domains distributed intermittently along mammalian myelinated axons. *J. Neurosci.* **20**, 8390-8400.
- Landry, C., Crine, P., DesGroseillers, L. (1991) Differential expression of neuropeptide gene mRNA within the LUQ cells of *Aplysia californica*. *J. Neurobiol* **23**: 89-101
- Martin KC et al. (1997) Synapse-specific, long-term facilitation of *aplysia* sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* **91**: 919-929.
- Martin KC et al. (2000) Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**: 587-592.
- Mohr, E., Richter, D. (1992) Diversity of messenger RNAs in the axonal compartment of peptidergic neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci* **4**: 870-876
- Montarolo P.G., Golet P., Castellucci V.F., Kandel E.R., and Schacher S. (1986). A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in *Aplysia*. *Scienze* **234**:1249-1254.
- Morgan, I.G., Austin, L. (1968). Synaptosomal protein synthesis in a cell-free system. *J. Neurochem* **15**: 41-51.
- Nixon, R., (1998) The slow axonal transport of cytoskeletal proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 87-92.
- Otani S. Marshall C.J., Tate W.P., Goddard G.V., and Abraham W.C. (1989). Maintenance of long-term potentiation in rat dentate gyrus requires protein synthesis but not messenger RNA synthesis immediately post-tetaniization. *Neurosci* **28**:519-526.
- Perrone Capano, C., Giuditta, A., Castigli, E., Kaplan, B.B. (1987) Occurrence and sequence complexity of polyadenylated RNA in squid axoplasm. *J. Neurochem* **49**: 698-704.
- Rao, A., Steward, O. (1991). Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specialization are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J. Neurosci* **11**: 2881-2895.
- Rapallino, M.V., Cupello, A. & Giuditta, A. (1988). Axoplasmic RNA species synthesized in the isolated squid giant axon. *Neurochem. Res.* **13**, 625-631
- Rosenzweig M. R., Krech D., Bennet E. L., Diamond M. C., (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **55**: 429-437.
- Rosenzweig M. R., Bennet E. L., Diamond M: C., (1969). Rat brain: effects of environmental enrichment on wet and dry weights. *Scienze*, **163**: 825-826.
- Sieghart, W., Singer, E. (1979). Sedimentation and release properties of glia particles present in P2-fraction isolated from rat cerebral cortex. *Brain Res* **170**: 203-208.
- Sotelo, J.R., Kun, A., Benech, J.C., Giuditta, A., Morillas, J., Benech, C.R. (1999) Ribosomes and polyribosomes are present in the squid giant axon: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **90**: 705-715
- Steward, O. & Schuman, E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* **40**, 347-359.
- Tobias GS, Koenig E (1975) Axonal protein synthesizing activity during the early outgrowth period following neurotomy. *Exp. Neurol.* **49**: 221-234.

- Trembleau, A., Morales, M., Bloom, F.E. (1996) Differential compartmentalization of vasopressin mRNA and neuropeptide within the rat hypothalamo-neurohypophyseal axonal tracts: light and electron microscopic evidence. *Neurosci* **70**: 113-125
- van Minnen, J. (1994). RNA in the axonal domain: a new dimension in neuronal functioning? *Histochem J.* **26**, 377-391.
- van Minnen, J., Bergman, J.J., van Kesteren, E.R., Smit, A.B., Garaerts, W.P., Lukowiak, K., Hasan, S.U., Syed, N.I. (1997). De novo protein synthesis in isolated axons of identified neurons. *Neurosci* **80**: 1-7
- von Bernhardi, R., Alvarez, J. (1989). Is the supply of axoplasmic proteins a burden for the cell body? Morphometry of sensory neurons and amino acid incorporation into their cell bodies. *Brain Res.* **478**: 301-308
- Verity MA. (1972). Cation modulation of synaptosomal respiration. *J Neurochem* **19**, 1305-1317.
- Verity MA, Brown WJ, and Cheung MK. (1979). On the mechanism of ouabain inhibition of synaptosome protein synthesis. *J Neurochem* **32**, 1295-1301
- Weiner, O. D., Zorn, A. M., Krieg, P. A., Bittner, G. D. (1996) Medium-weight neurofilament mRNA in goldfish Mauthner axoplasm. *Neurosci. Lett.* **213**: 83-86
- Weiss, P., Hiscoe, H.B. (1948). Experiments on the mechanism of nerve growth. *J. Exp. Zool.* **107**: 315-393.
- Wensley C.H., Stone D.M., Kauer J.S., Margolis F.L., Chikaraishi D.M., (1995). Olfactory marker protein mRNA is found in axon of olfactory neurons. *J. Neurosci.* **15**: 4827-4837.
- Whittaker VP (1993) Thirty years of synaptosomal research. *J. Neurocytol.* **14**: 726-733.

